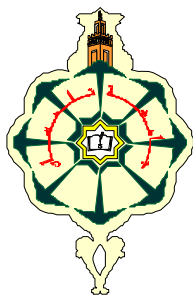


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr-Belkaid Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

Présenté

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie, Option: Biochimie Appliquée

Par

Mr. BELHACHEMI Mohammed Habib

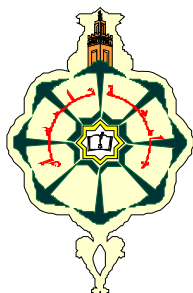
**Etude de l'effet de quelques antioxydants sur l'activité fongitoxique
de l'amphotéricine B**

Soutenu le :

Président	Mr. DRISSI Mourad	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Promoteur	Mr. BOUCHERIT Kebir	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Examinatrices	Mme. BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
	Mme. MOKHTARI Nassima	Maître de Conférences A, Université Tlemcen

Année universitaire: 2011-2012

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr-Belkaid Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

Présenté

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie, Option: Biochimie Appliquée

Par

Mr. BELHACHEMI Mohammed Habib

**Etude de l'effet de quelques antioxydants sur l'activité fongitoxique
de l'amphotéricine B**

Soutenu le :

Président	Mr. DRISSI Mourad	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Promoteur	Mr. BOUCHERIT Kebir	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Examinatrices	Mme. BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
	Mme. MOKHTARI Nassima	Maître de Conférences A, Université Tlemcen

Année universitaire: 2011-2012

Remerciements

J'adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

J'adresse mes vifs remerciements à mon promoteur Monsieur BOUCHERIT Kebir., Maître de conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse sous sa direction et offert la possibilité de travailler sur un sujet passionnant, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger cette thèse, ses connaissances scientifiques, la qualité de son enseignement et pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer malgré ses charges académiques et professionnelles.

Je souhaite remercier particulièrement Mme BOUCHERIT-OTMANI Zahia., Maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, directrice du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique », de m'avoir accueilli dans son laboratoire, aussi pour sa générosité et sa grande patience d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examen. Ses conseils et ses commentaires précieux m'ont permis de surmonter mes difficultés et de progresser dans mes études. Un autre grand merci pour son accueil chaleureux et sa bonne humeur inoubliable.

Je tiens à remercier aussi Monsieur DRISSI Mourad, Maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Je suis très honorée que Madame MOKHTARI Nassima née SOULIMANE Maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, ait accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mr. RAHMOUN Mohammed Nadjib, ingénieur du laboratoire, pour l'effort fourni, son esprit scientifique, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire, en particulier: Mrs. DJAZIRI Rabah, AZZI Rachid, Melle BENARIBA Nabila, et Melle BELKACEM Nacéra pour leur aide.

Mes remerciements à Melle BELABASSI Chrifa, responsable de Laboratoire de microscopie, Département de physique -Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pour son aide et sa gentillesse.

J'adresse également mes remerciements, à tous mes enseignants.

Je tiens à remercier chaleureusement Melle BELMIR Sara et Mr BENBEKHTI Zinedine pour leur aide et la bonne ambiance dans le laboratoire. Ainsi toute la promotion : Samir, Wassila, Djahida, Imen et Wafaa, pour la bonne humeur générale.

Je remercie, du fond du cœur mon ami, ELHACI Imad Abd elhamid, qui m'a toujours encouragé à m'investir à fond dans ce travail.

Je n'oublierais pas tous les autres avec qui j'ai pu travailler ou échanger de bons moments dans le laboratoire: Nourddine, Djamila, Mohammed, Dounia, Rabha, Meriem, Houria, Wafaa et Ismahane.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mon père pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.

Mon adorable mère qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ses enfants grandissent et prospèrent.

Que Dieu les protège et que ce travail soit la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour pour eux.

Mes frères Fouad, son épouse Zahira et la petite Douaa Fatima Zohra, Abderrahmen et mes sœurs Souad et Aïcha pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant, pour être coopératifs et aptes à assumer à ma place certaines de mes responsabilités familiales.

Ma fiancée Sara pour être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour avoir donné du goût à ma vie par son amour et sa tendresse, j'espère qu'elle trouvera ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Ma belle-famille pour son soutien, gentillesse et sympathie, que dieu les protège et leurs donne une vie pleine de réussite et de bonheur.

المخلص

زاد انتشار الإصابة بالعدوى الفطرية، بما في ذلك المنقولة عن طريق الدم، بشكل كبير في السنوات الأخيرة. يقوم العلاج المعياري لهذه الإصابات على استخدام الأمفوتريسين ب على الرغم من كونها مصدر لأعراض جانبية شديدة السمية، التي قد تهدد حياة المصاب في بعض الأحيان. العمل الذي قمنا به يتركز من ناحية على تقييم فعالية الأمفوتريسين ب في وجود بعض مضادات الأكسدة الطبيعية (فيتامين (C) "حمض الأسكوربيك" وفيتامين (E) "α توكوفيرول") على نشاط الخميرة *Candida albicans* ATCC 10231 و من ناحية أخرى باختبار السمية لهذه المستحضرات على خلايا الدم الحمراء. أظهرت النتائج تحسنا ملحوظا في كفاءة صيغنا المختبرة مقارنة بالأمفوتريسين ب وحده عند التركيز 0,4 ميكرو مول. فنلاحظ، أن درجة تثبيط الأمفوتريسين ب في وجود الفيتامين C عند التركيز النهائي 1,4 ملغ / مل قد ارتفع إلى 7 % و إلى 12 % في وجود فيتامين (E) عند التركيز النهائي 8 ميكرو غ / مل. فيما يتعلق باختبار السمية، إضافة فيتامين (C) وفيتامين (E) بتركيزين مختلفين 1,4 ملغ/مل و 8 ميكروغ/مل، على التوالي، يقلل من التأثير السام الناجم عن الأمفوتريسين ب من معدل 85 % إلى معدل 69 %.

كلمات البحث: *Candida albicans*، الأمفوتريسين ب، فيتامين (C)، فيتامين (E)، مضادات الأكسدة، الفعالية، اختبار السمية

Résumé

L'incidence des infections fongiques ou mycoses, notamment hématogènes, a considérablement augmenté au cours des dernières années. Le traitement de référence pour ces infections est basé sur l'utilisation de l'amphotéricine B malgré qu'elle soit à l'origine de phénomènes toxiques très sévères mettant en jeu parfois le pronostic vital.

Le travail que nous avons entrepris a porté, d'une part, sur l'évaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en présence de quelques antioxydants naturels (vitamine C « acide ascorbique » et vitamine E « α tocophérol ») ; vis-à-vis la levure *Candida albicans* ATCC 10231 d'une part. D'autre part, nous avons testé la cytotoxicité de ces formulations sur les globules rouges humains.

Les résultats obtenus ont montré une nette amélioration de l'efficacité de nos formulations testées par rapport à l'amphotéricine B seule à une concentration finale de 0,4 µM. En effet, le degré d'inhibition est de 7% en présence de la vitamine C à une concentration finale de 1,4 mg/ml et de 12 % en présence de la vitamine E à une concentration finale de 8 µg/ml. Par ailleurs, l'addition de la vitamine C et la vitamine E, protège les globules rouges humains contre la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B. En effet, la fuite de l'hémoglobine passe de 85 % en présence d'amphotéricine B seule à 69 % en présence d'amphotéricine B complexée aux deux vitamines étudiées.

Mots clés : *Candida albicans*, Amphotéricine B, Vitamine C, Vitamine E, Pouvoir antioxydant, Efficacité, Cytotoxicité

Abstract

The incidence of fungal infections or mycoses, including hematogenous, has increased dramatically in recent years. The reference treatment for these infections is based on the use of amphotericin B despite being the source of severe toxic reactions, sometimes involving life-threatening.

The work we have undertaken focused on valuating the effectiveness of amphotericin B in the presence of some natural antioxidants (vitamin C "ascorbic acid" and vitamin E "α tocopherol") towards the yeast *Candida albicans* ATCC10231 for one thing. Secondly, we tested the cytotoxicity of these formulations on human red blood cells.

The results obtained showed a marked improvement in the efficiency of our formulations tested against amphotericin B alone 0.4 µM. Indeed, the degree of inhibition of amphotericin B in the presence of Vitamin C at a final concentration of 1.4 mg/ml increase of 7 % and 12 % in the presence of vitamin E to a final concentration of 8 µg/ml. Concerning the cytotoxicity, the addition of vitamin C and vitamin E at the concentrations, 1.4mg/ml and 8 µg/ml respectively, reduces the toxic effect induced by amphotericin B of a hemolysis rate of 85 % to 69 %.

Keywords: *Candida albicans*, amphotericin B, Vitamin C, Vitamin E, Antioxidant, efficacy, Cytotoxicity

Liste des abréviations

AmB	Amphotéricine B
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DHA	Acide Déshydroascorbique
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EOA	Espèces Oxygénées Activées
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
HDL	Hight-Density Lipoprotein
LAPSAB	Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique
LDL	Low-Density Lipoprotein
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
Vit	Vitamine

Table des matières

Introduction	01
Première partie : Synthèse bibliographique	04
1. Caractéristiques physico-chimiques de l'amphotéricine B.....	05
2. Différentes formulations de l'amphotéricineB.....	08
2.1 Modifications galéniques.....	08
2.2 Modifications chimiques.....	09
3. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	11
4. Peroxydation lipidique de l'amphotéricine B	18
4.1. Vitamine C	20
4.2. Vitamine E	23
Deuxième partie: Matériel et Méthodes	25
1. Matériel.....	26
1.1. Antifongique.....	26
1.2. Vitamines.....	26
1.3. <i>Candida albicans</i>	26
1.4. Globules rouges humains	26
2. Méthodes.....	26
2.1. Détermination de l'activité antifongique en milieu liquide.....	26
2.2. Etude microscopique.....	27
2.2.1 Mode opératoire.....	27
2.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	27
2.4. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	30
2.5. Etude de la toxicité de nos formulations vis à vis des globules rouges humains ...	30
2.5.1. Préparation de la suspension érythrocytaire	30
2.5.2. Préparation des solutions Antifongiques	30

2.5.3. Evaluation de la toxicité de nos formulations vis à vis des globules rouges humains	31
Troisième partie: Résultats et Discussion	32
1. Evaluation de l'activité antifongique.....	33
1.1. Détermination de l'activité antifongique sur milieu liquide (time-kill curve).....	33
1.1.1. Effet de l'addition de la vitamine C.....	33
1.1.2. Effet de l'addition de la vitamine E.....	39
1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicide (CMF).....	45
2. Etude de la toxicité de nos formulations vis à vis des globules rouges humains	46
Quatrième partie : Conclusion générale	51
Conclusion générale.....	52
Cinquième partie : Références bibliographiques	53
Références bibliographiques.....	54

Introduction

Les candidoses systémiques ou profondes, dont la fréquence a augmenté, sont associées à une mortalité élevée. Cette mortalité reste lourde en raison du délai au diagnostic, et du terrain sur lequel elles surviennent. En effet, le nombre de ces infections a considérablement augmenté depuis 25 ans, en raison d'une extension de la population à risque constituée essentiellement d'immunodéprimés à savoir les personnes atteintes d'un cancer, infectées par le VIH ou ayant subi une greffe d'organe solide, les patients diabétiques, cirrhotiques ou insuffisants rénaux, les patients d'âge extrême, dénutris ou malnutris, et ceux porteurs d'hémopathies malignes, et aussi de l'allongement de la survie des patients qui la constituent.

L'apparition de résistance aux antifongiques chez certains microorganismes et l'inefficacité d'une antifongothérapie pour protéger l'organisme contre l'envahissement de certaines souches pathogènes constituent un problème sérieux. Ainsi, depuis 1950, l'année de la découverte de la nystatine par HAZEN et BROWN, plusieurs antifongiques furent isolés, mais un nombre très restreint est utilisé à des fins thérapeutiques du fait de leur toxicité et/ou de leur inactivité *in vitro*.

C'est seulement depuis cette dernière décennie que la thérapeutique antifongique s'est réellement développée mais malgré plus de cinquante ans d'utilisation, l'amphotéricine B reste encore l'antifongique polyénique de premier choix dans les infections fongiques profondes, en raison de son spectre très large, de son effet fongicide intense et de l'apparition de relativement peu de cas de résistance. La mise à disposition des dérivés azolés qui sont mieux tolérés que l'amphotéricine B a suscité de grands espoirs malheureusement déçus par l'apparition de cas de résistances de plus en plus fréquentes (**SCHOLER et POLACK, 1984**). De plus, les dérivés azolés, contrairement à l'amphotéricine B, sont plutôt des inhibiteurs de la croissance des cellules fongiques (**CARBON et coll. 1994**). Ce regain d'intérêt pour l'amphotéricine B a incité la renaissance des études concernant cette molécule.

En effet, au sein du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » de l'université de Tlemcen, plusieurs formulations de l'amphotéricine B avec un coût moins dispendieux ont été élaborées dans le but d'améliorer son index thérapeutique (c'est-à-dire augmenter son efficacité vis-à-vis des levures et des fongis tout en réduisant sa toxicité vis-à-vis des cellules animales comme les nôtres). Ces dernières sont basées essentiellement soit sur la complexation de cette drogue aux lipoprotéines sériques (HDL, LDL) soit sur la modulation de son environnement physico-chimique (pH, Température, nature du solvant...).

Par ailleurs, la cytotoxicité de l'amphotéricine B est liée aux espèces réactives de l'oxygène produites par la dégradation auto oxydative de cet antifongique, responsables de son activité peroxydative au niveau des membranes cellulaires. Il résulte de cette réaction une oxydation des acides gras insaturés des phospholipides ce qui induit une augmentation de la sensibilité des cellules au choc osmotique d'où la fragilisation des membranes cellulaires [(LAMY-FREUND et coll., 1991) ; GABORIAU et coll., 1997)].

Ces résultats ont orienté les chercheurs vers le choix des antioxydants pour piéger les radicaux libres afin de protéger ou d'empêcher la propagation de ce mécanisme de dommage irréversible. En effet, ANDREWS et coll., (1977) ainsi que BEGGS et coll., (1977), ont montré que l'addition de quelques antioxydants (n-propyl gallate, hydroxyanisole butylé, hydroxytoluène butylé, acide nordihydroguaiarétique et l'acide D- α -tocopherol succinate) protège l'amphotéricine B contre son autodégradation et préserve ainsi son activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans*. En revanche, les travaux de BRAJTBURG et coll. (1985) et de SOKOL-ANDERSON et coll., (1986), ont mis en évidence l'effet protecteur de la catalase contre les dommages oxydatifs induits par l'amphotéricine B vis-à-vis des érythrocytes humains et des cellules fongiques.

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes intéressé à étudier l'effet de l'incorporation de deux molécules antioxydantes (la vitamine C et la vitamine E) dans le milieu réactionnel sur l'activité fongitoxique de l'amphotéricine B.

Pour ce faire, nous avons évalué dans un premier temps, l'activité antifongique de l'amphotéricine B en présence de la vitamine C « acide ascorbique » et la vitamine E « α tocophérol » ; vis-à-vis de la levure *Candida albicans* ATCC 10231.

Dans un deuxième temps, nous avons suivi la cytotoxicité des formulations testées vis-à-vis d'un modèle universel de cellules animales, le globule rouge humaine.

Première partie:
Synthèse
bibliographique

1. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMPHOTERICINE B :

L'amphotéricine B (AmB) est un antifongique, produit par fermentation d'un actinomycète du sol *Streptomyces nodosus*. Elle fut isolée pour la première fois en 1956 par GOLD et coll., sa structure chimique a été établie en 1970 [(CARLE, 2003); (PASQUALOTTO, 2009)]. (Figure N°01 a)

Elle fait partie de la famille des macrolides polyéniques (famille d'agents macrocycliques), et comporte dans sa structure deux parties :

- Une partie hydrophile poly hydroxylée polaire, avec une fonction lactone contenant un groupement carboxyle COOH, et un amino-sucre (la mycosamine) contenant un groupement amine NH₂.
- Une partie polyène lipophile apolaire contenant 7 doubles liaisons conjuguées en configuration trans, caractérisées par une forte intensité spectrale qui permet de les étudier par des méthodes spectroscopiques.

La présence des groupements NH₂ et COOH confère à l'amphotéricine B l'aspect amphotère. La présence des deux chaînes polaires et apolaires (Figure N°01, b) lui confère un caractère amphiphile et une forme allongée en bâtonnet (KÉRI et TÓTH, 2003).

Cette structure stéréochimique avec des dimensions moléculaires de 6Å de hauteur, 7Å de largeur, et 24 Å de longueur (Figure N°01 b), est responsable en grande partie de la formation des pores (WOJTOWICZ et coll., 1998).

L'amphotéricine B comporte 47 atomes de carbone, son poids moléculaire est de 960. Elle se présente sous forme de poudre jaune instable, insoluble en milieu aqueux, peu soluble dans les solvants organiques apolaires comme l'éther de pétrole, et soluble dans les solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF), elle se conserve à 4°C à l'abri de la lumière (COHEN et JACQUOT, 2008).

La toxicité de cet antifongique est liée en grande partie à son insolubilité en milieu aqueux. En effet, l'addition de sels biliaires tel que le désoxycholate de sodium entraîne la formation de micelles mixtes avec l'amphotéricine B, ce qui permet sa mise en suspension colloïdale dans du sérum glucosé à 5% (commercialisée sous le nom de Fungizone[®]) [(CHAVANET, 1997); (COLLIGNON et coll., 2007)].

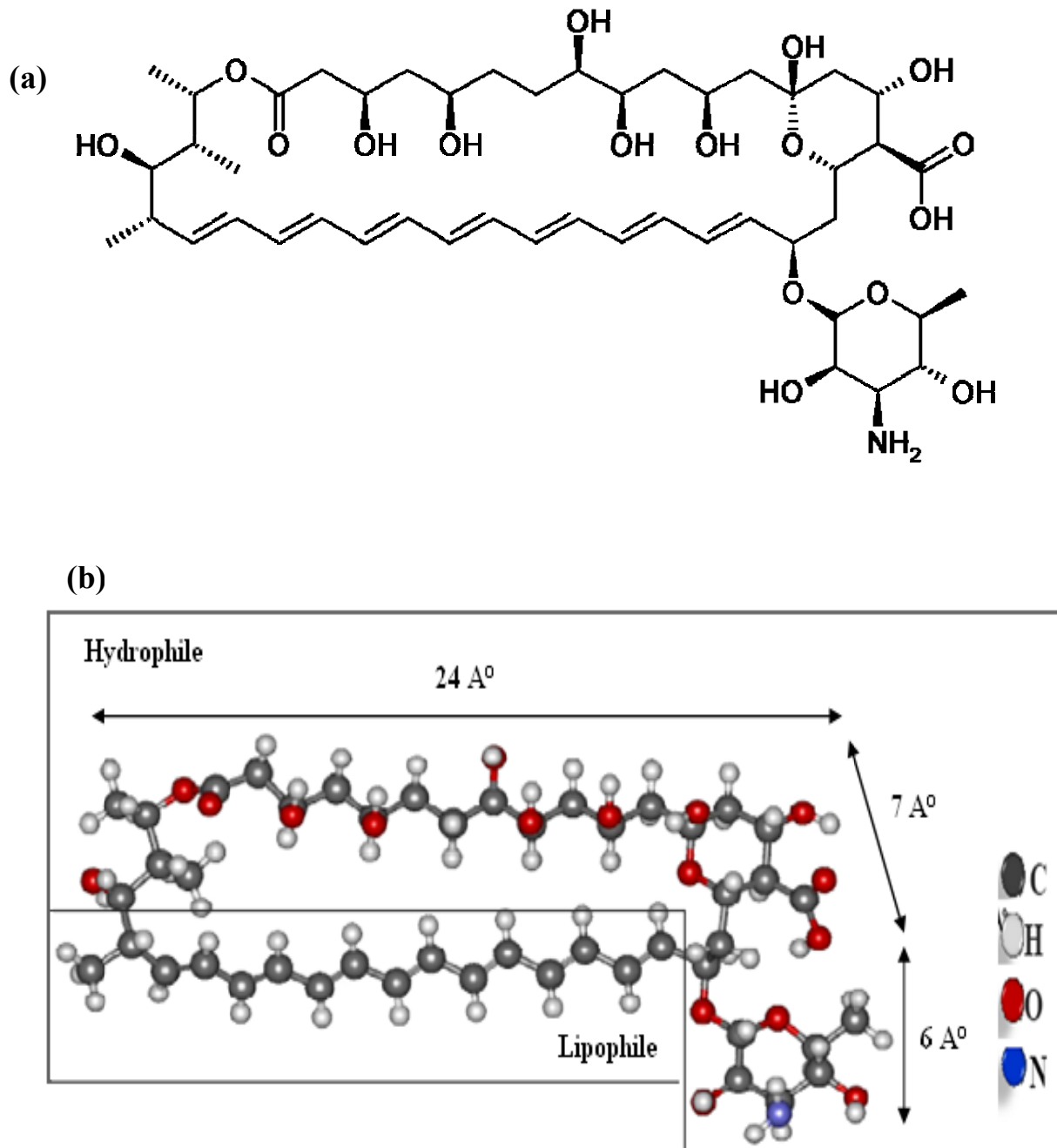


Figure N°01: Structure chimique (a), modèle tridimensionnel avec les dimensions moléculaires (b) de l'amphotéricine B [(VAN –BAMBEKE, 2009); (CARRILLO-TRIPP et coll., 2010)].

En solution aqueuse, l'amphotéricine B se répartit schématiquement en trois états:

- une forme agrégée responsable de la toxicité,
- une forme oligomère (essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité,
- une forme monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique **(COLLIGNON et coll., 2007)**.

L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé. Il varie selon la concentration d'AmB et le solvant. On comprend alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion de forme toxique d'AmB, en se rappelant que cette molécule est amphotère **[(LEGRAND, 1992); (CHAVANET, 1997)]**.

Sa posologie est de 0,5 à 1 mg/Kg/24h en cas d'insuffisance cardio-pulmonaire, et jusqu'à 1 mg/Kg/24h ou 1,5 mg/Kg tous les 2 jours pour les infections sévères causées par les germes les moins sensibles à cette drogue, et ceci pour une durée de traitement de 6 à 12 semaines ou plus **(CHEVREL, 2009)**.

Cet antifongique est indiqué principalement dans les cas sévères (chocs septiques) qui pourraient être dus à des infections fongiques causées par *Candida sp.* ou autres, comme les *Aspergilloses* et les *cryptococcoses*, mais il est également un antiparasitaire de premier ordre, utilisé pour traiter les leishmanioses et certaines amibiases. Il est contre indiqué chez les femmes enceintes et les personnes pouvant avoir des allergies connues **[(ELLIS, 2002); (LEMKE et coll., 2005); (VANDEPUTTE, 2008)]**.

L'absorption digestive de l'amphotéricine B est très faible (moins de 5%). De ce fait, il est indispensable de l'administrer par voie parentérale pour traiter les mycoses systémiques **(PERLEMUTER et PERLEMUTER, 2008)**.

L'absorption de l'amphotéricine B au niveau de l'intestin est négligeable, ce qui explique que jusqu'à présent il n'y a pas de toxicité générale **(CASAMAJOR et DESCROIX, 2009)**.

Après injection intraveineuse, 90% du produit disparaît du sang et passe dans un compartiment central (secteur vasculaire), puis se distribue entre deux compartiments périphériques non identifiés; l'un d'équilibration rapide et l'autre d'équilibration lente, la demi-vie initiale est d'environ 24h suivie par une demi-vie plasmatique d'environ 15 jours, sa liaison aux protéines (albumine α .1-glycoprotéine acide) et aux lipoprotéines sériques est très élevée ($\geq 90\%$) **[(COLLIGNON et coll., 2007); (MARTIN, 2008)]**.

L'élimination est surtout biliaire, l'élimination rénale est faible et prolongée; 20 à 30% de la dose injectée sont souvent retrouvées dans les urines au 7^{eme} jour (**MARTIN, 2008**).

Les effets indésirables les plus fréquents se traduisent par des céphalées, frissons, fièvres, hypotensions, troubles rénaux et métaboliques, hypokaliémie, et hypomagnésémie (**PERLEMUTER et PERLEMUTER, 2008**), qui sont dus à la toxicité de cette drogue (**KLEINBERG, 2010**).

2. DIFFERENTES FORMULATIONS DE L'AMPHOTERICINE B :

Afin de réduire la toxicité de l'amphotéricine B (qui est liée à la formation de complexes binaires en forme de pores dans les cellules animales), et d'augmenter son efficacité vis-à-vis des cellules fongiques, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour obtenir des formulations de cet antifongique sous sa forme monomérique. Rappelons que ce sont les formes oligomériques solubles et agrégées insolubles qui sont toxiques vis-à-vis des cellules animales, et que la toxicité de l'amphotéricine B est liée principalement à son insolubilité [(**ADAMS et KWON, 2004**); (**NISHI et coll., 2007**)].

2.1 Modifications galéniques :

L'association de l'amphotéricine B aux sels biliaires tels que le désoxycholate de sodium conduit à une dispersion colloïdale neutre, et moins toxique que l'amphotéricine B pure, commercialisée sous le nom de Fungizone[®] (**ERIKSSON et coll., 2001**).

Les travaux de **BRATJBURG et coll.**, (1990) et (1994) ont montré que les mélanges de lécithine et de désoxycholate diminuent la toxicité de l'amphotéricine B et augmentent son index thérapeutique. L'association de l'amphotéricine B aux agents tensioactifs non ioniques tels que MYRJ59 et Lauryl-sucrose permet elle aussi de réduire sa toxicité vis-à-vis des globules rouges, et de conserver son efficacité vis-à-vis des cellules fongiques du genre *Candida albicans* (**BRATJBURG et BOLARD, 1996**).

De plus, l'association des copolymères poly (2-éthyl-2-oxazoline)-block-poly (acide aspartique) (PEOz-b-PASP) à l'amphotéricine B; « Polyions complexes micelles PIC » a montré une cytotoxicité inférieure à celle de la Fungizone[®], et donc se révèle comme un autre moyen efficace d'encapsuler cette drogue (**WANG et coll., 2009**).

Cependant, parmi toutes ces formulations, les formulations lipidiques restent les plus prometteuses, le seul inconvénient est le coût onéreux. Trois de ces formulations sont mises sur le marché :

- Abelcet[®] : L'association de l'amphotéricine B au Dimyristoyl phosphatidylcholine et Dimyristoyl phosphatidylglycérol a permis d'avoir de l'amphotéricine B en complexe lipidique.
- Amphotec[®] ou Amphocil[®] : L'association de l'amphotéricine B au sulfate de cholestérol s'est révélée beaucoup moins toxique que l'amphotéricine B libre ou liée au désoxycholate, et ceci grâce au pouvoir solubilisant de ce dérivé de cholestérol.
- Ambisome[®] : L'incorporation de l'amphotéricine B dans des liposomes unilamellaires constitués de phosphatidylcholine hydrogéné de cholestérol et de distéaroyl phosphatidylglycérol a augmenté son index thérapeutique [(ANDRES et coll., 2001); (PRADALIER et coll., 2005)].

2.2 Modifications chimiques :

De nombreux dérivés semi synthétiques d'amphotéricine B ont été décrits dans la littérature. Ces derniers sont obtenus par modification des 2 groupes ionisables de l'antifongique, à savoir le groupe COO^- et NH_3^+ . Cette modification entraîne une transition conformationnelle. Deux de ces dérivés, la PAME (N-(1-Piperidinepropionyl) Amphotéricine B MéthylEster) (Figure N°02b) et la SAME (N-(N'-3-Diméthyl aminopropyl-succinimido) Amphotéricine B MéthylEster) (Figure N°02c) (dérivés cationiques) montrent une importante sélectivité par rapport à la molécule mère d'AmB, et peuvent pénétrer plus profondément dans les régions hydrophobes [(CZUB et coll., 2007); (CZUB et coll., 2009)].

De plus, d'autres études ont montré que pour avoir une hémolyse des globules rouges il faut $2\mu\text{g/ml}$ d'amphotéricine B, alors qu'il faut jusqu'à $300\mu\text{g/ml}$ de la PAME pour avoir 50% d'hémolyse (HAC-WYDRO et coll., 2005). Ces dérivés semblent améliorer la toxicité sélective de la molécule mère d'amphotéricine B.

Un autre dérivé qui est l'AMA (Amphotéricine B-3- (N'N'-diméthylamino) propylamide) (Figure N°02d), est utilisé à des fins de vectorisation d'oligonucléotides antisens (ODN) dans les cellules animales (HIANIK et coll., 2008).

A travers les résultats obtenus pour ces dérivés cationiques, on peut déduire que la voie de recherche de nouveaux dérivés chimiques qui tendent surtout à améliorer la sélectivité de l'AmB vis-à-vis des cellules fongiques, est également très prometteuse.

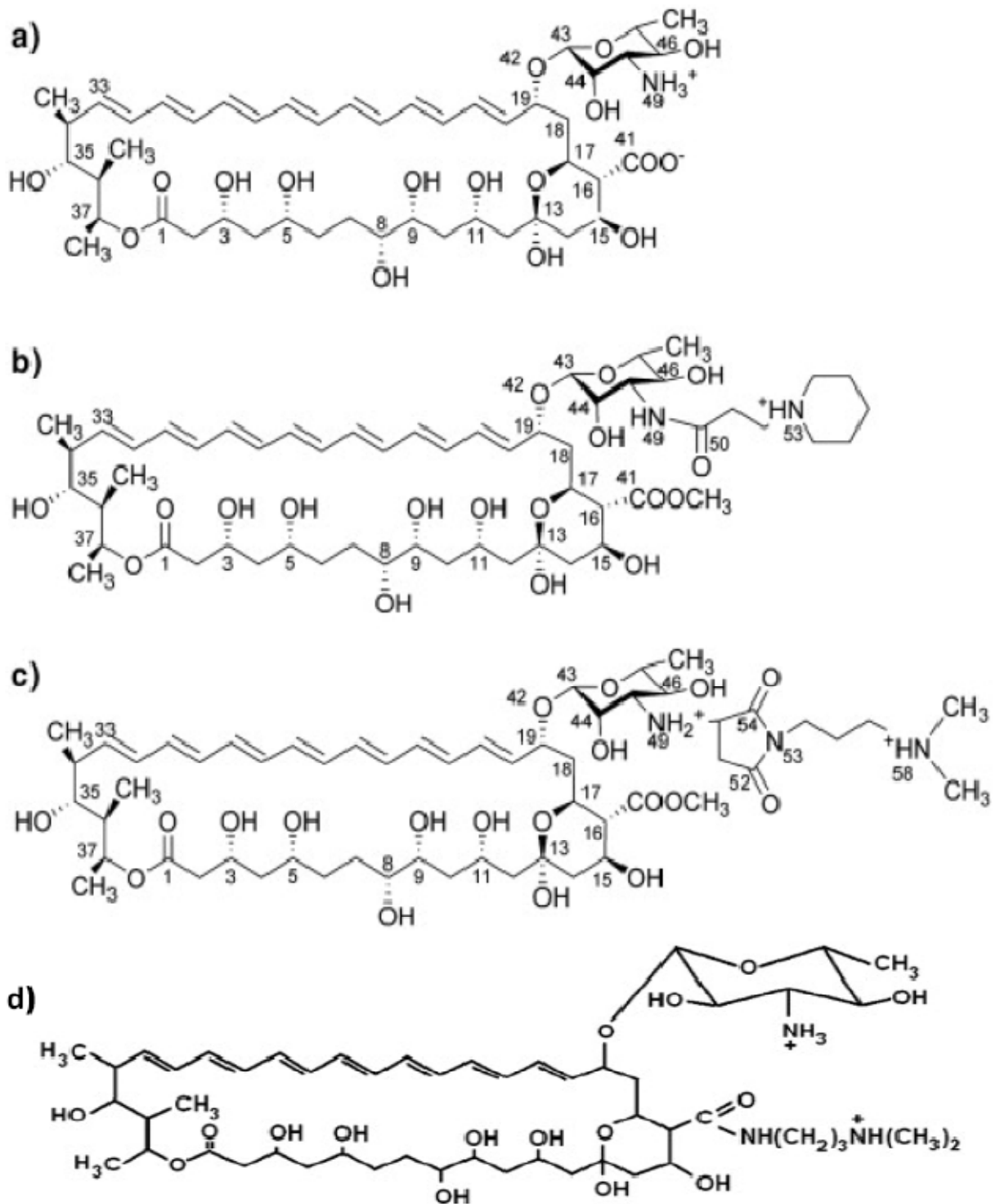


Figure N°02 : Structure de l'amphotéricine B (a), et des trois dérivés semi synthétiques PAME (b), SAME (c) (CZUB et coll., 2009), et AMA (d) (HIANIK et coll., 2008).

3. MECANISME D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B :

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé, il reste généralement admis que la toxicité de l'amphotéricine B s'exerce principalement au niveau des membranes contenant des stérols (cellules fongiques et levures qui renferment de l'ergostérol et cellules de mammifères qui contiennent du cholestérol) [(CZUB et coll., 2007); (HEREĆ et coll., 2007)].

L'amphotéricine B serait à l'origine d'une perméabilisation membranaire accrue qui initierait un gonflement cellulaire suivant les modifications du flux ionique, en particulier au niveau des ions monovalents Na^+ et K^+ , précédant la mort cellulaire. En effet, de nombreuses études ont montré une corrélation entre la fixation membranaire de l'antifongique et son action perméabilisante, précisant le rôle des lipides membranaires et plus particulièrement les stérols dans l'interaction AmB-membrane (MONÉ et coll., 2010).

Les travaux de SAFE et coll., (1977), ont montré que trois souches de *Candida* résistantes à l'amphotéricine B contiennent les mêmes stérols que les souches sensibles mais en concentration plus faible.

De plus, l'inhibition de la synthèse du cholestérol par addition du kétoconazole, permet une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B envers les cellules rénales en culture (JOLY et coll., 1992).

L'interaction amphotéricine B-stérol dépend de la composition membranaire en phospholipides (CLEJAN et BITTMAN, 1985). Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* enrichies en phospholipides de type phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS), acquièrent une résistance envers l'amphotéricine B (RAO et coll., 1985).

L'induction par l'amphotéricine B d'une perméabilisation transmembranaire aux ions est reliée à la formation de canaux d'un diamètre de 8Å. Ces derniers sont formés de 8 à 12 molécules d'antifongique agrégées. L'ensemble constitue un canal ancré à la surface membranaire par ses groupes chargés dont l'intérieur est tapissé de groupes hydroxyles (Figure N°03).

Le problème posé par ce modèle vient du fait que les canaux n'étaient pas assez longs pour s'étendre sur toute l'épaisseur de la bicouche lipidique, pour les longueurs de chaînes acyls des phosphatidylcholines rencontrés dans les membranes des cellules. Ils correspondent plutôt à un seul feuillet.

L'observation comme quoi l'amphotéricine B avait une activité sélective maximale vis à vis des anions quand ils étaient présents des deux côtés de la membrane lipidique et l'existence d'un groupement OH en C35 suggère que 2 demi-pores pouvaient se superposer au sein de la membrane par des liaisons hydrogène. C'est pourquoi le modèle proposé par DE KRUIJFF et DEMEL (1974), constitué de demi pores cations sélectifs et de double demi pores anions sélectifs est resté la référence en matière de mécanisme d'action de cet antifongique.

De plus, une étude faite par modélisation moléculaire a montré que 6 à 8 molécules d'amphotéricine B seraient impliquées dans la formation du canal, les interactions par liaisons hydrogène seraient indispensables pour que le canal reste à l'état ouvert (**BAGINSKI et coll., 2005**]. (Figure N°04)

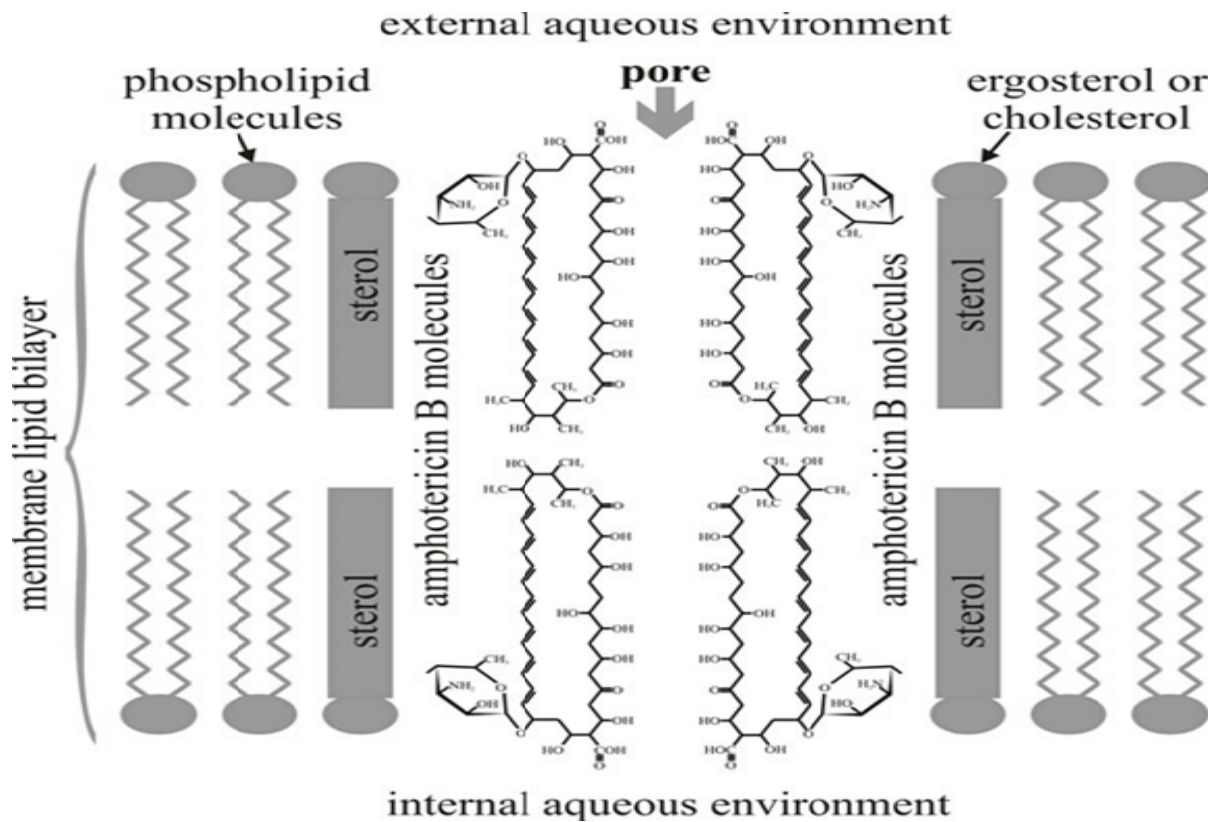


Figure N°03 : Structure schématique d'un pore amphotéricine B-stérol (MOORE et coll., 2010)

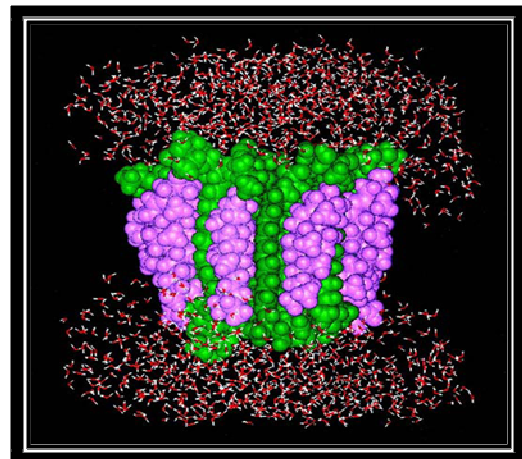
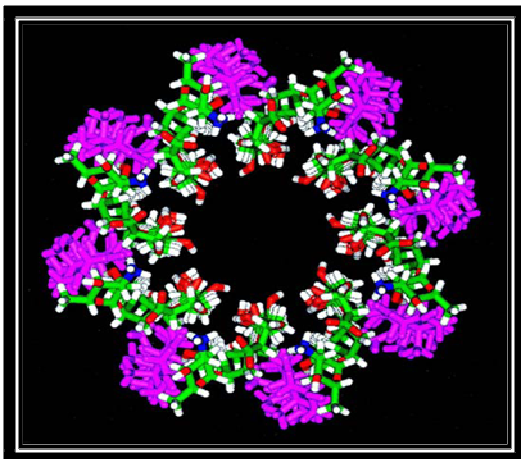


Figure N°04 : Modélisation tri-dimensionnelle du pore formé par l'amphotéricine B au sein de la bicouche lipidique de la membrane fongique, d'après BAGINSKI et coll., 1997.

Amphotéricine B : blanc : les protons (H), vert : l'atome de Carbone (C), rouge : l'atome d'oxygène (O), bleu : l'atome de nitrogène (N); violet: ergostérol.

Cependant, la sélectivité de l'amphotéricine B envers les cellules fongiques est due à une plus grande affinité de cette drogue pour l'ergostérol membranaire [(KERRIDGE, 1979); (KITO et coll., 1987); (SEOANE et coll., 1998)].

Des méthodes physiques reposant sur les spectres d'absorption ont permis de confirmer cette spécificité et de montrer que l'amphotéricine B se lie 10 fois plus à l'ergostérol qu'au cholestérol (BAGINSKI, 2002).

Cette grande affinité pour l'ergostérol s'expliquerait par :

- La présence d'une double liaison en C22 sur l'ergostérol renforcerait l'interaction mettant en jeu la chaîne rigide (7 doubles liaisons) de l'amphotéricine B et la molécule de stérol
- La conformation plane de l'ergostérol serait plus propice à une interaction avec l'amphotéricine B que le cholestérol, dont la chaîne latérale sans double liaison en C22 est plus flexible (NORMAN et coll., 1972). (Figure N°05)
- Les travaux de BRAJTBURG et coll., (1981 et 1980) ont montré que la toxicité cellulaire de l'amphotéricine B vis à vis des cellules fongiques et animales est dose dépendante.
- Effet stimulateur vis-à-vis des cellules de *Candida albicans* à des doses de l'ordre de 0,01 μM et vis-à-vis de lignées de cellules animales comme les lymphocytes à des doses $<1\mu\text{M}$.
- Effet perméabilisant membranaire cationique (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) à des doses de l'ordre de 0,02 à 0,1 μM pour *Candida albicans* et entre 1 et 10 μM pour les lymphocytes. Les dommages membranaires à l'origine de la fuite des ions concernent aussi l'inhibition de l'ATPase à protons des cellules fongiques et de l'ATPase Na^+/K^+ des cellules animales.
- Effet léthal après la perméabilisation irréversible de la membrane aux cations à des doses $>0,3\mu\text{M}$ pour *Candida albicans* et de 20 μM pour les lymphocytes.

Ces différents phénomènes ne peuvent pas s'expliquer uniquement par la formation de pores transmembranaires et par des changements de perméabilité. D'autres mécanismes doivent intervenir si nous considérons que les doses d'amphotéricine B généralement nécessaires à la destruction des cellules sont nettement supérieures à celles qui provoquent une fuite des cations.

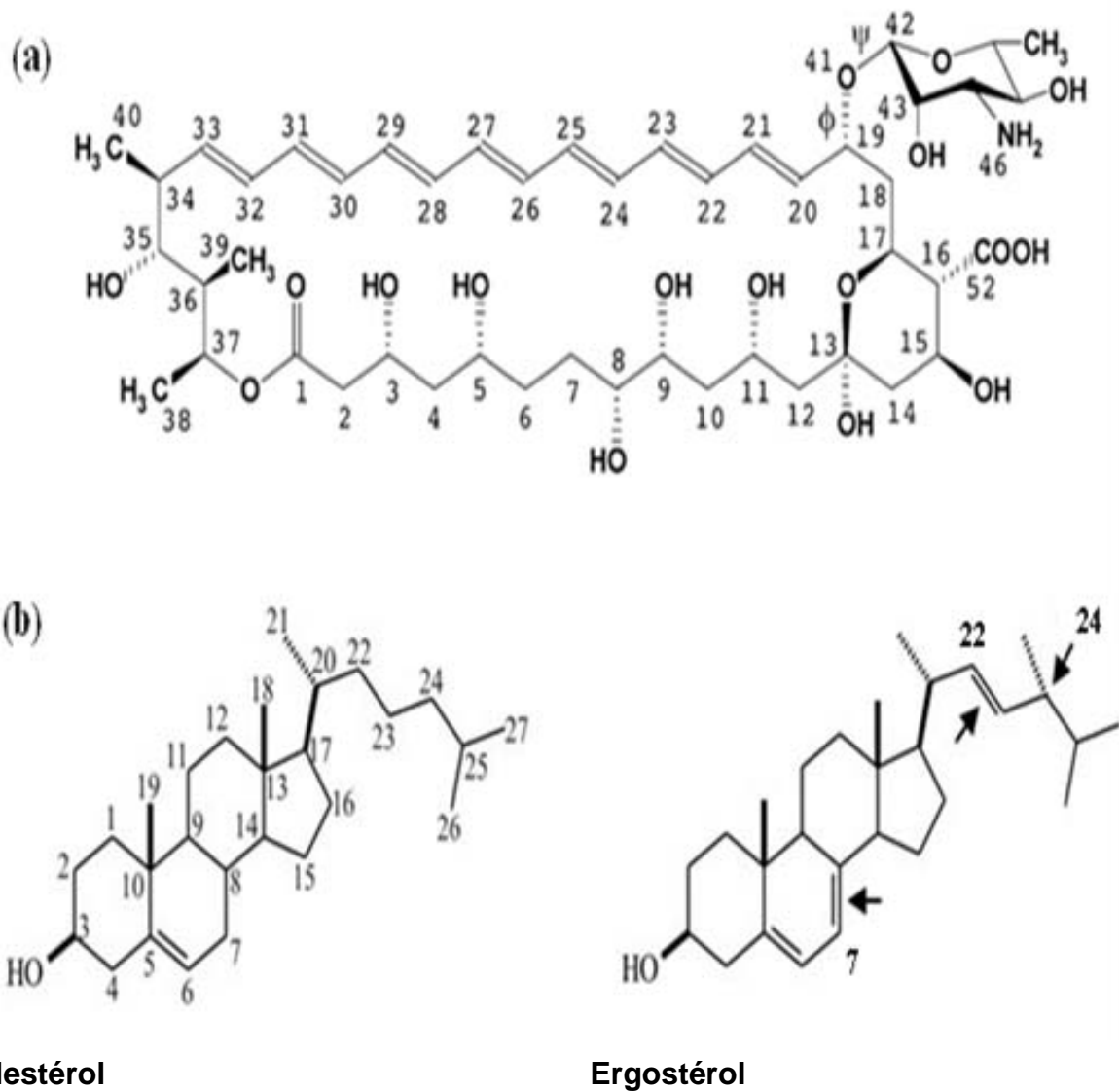


Figure N°05 : Interaction de l'amphotéricine B (a) avec le cholestérol et l'ergostérol (b)
(GABRIELSKA et coll., 2006)

En 1994 VERTUT-DOÏ et coll., ont mis en évidence un autre mécanisme d'action de l'amphotéricine B, au niveau du processus d'endocytose chez une lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovary). A fortes doses l'antifongique serait susceptible d'inhiber la fusion endosomes-lysosomes tout en stimulant son internalisation par la pinocytose.

Ainsi la peroxydation des lipides membranaires pourrait être un des phénomènes responsables de la destruction des cellules. Ce phénomène est déterminant dans l'effet toxique de l'amphotéricine B sur les sphéroplastes de *Candida albicans* (SOKOL-ANDERSON et coll., 1986) et les globules rouges (BRAJTBURG et coll., 1985). Selon SOKOL-ANDERSON et coll., (1986), la toxicité de l'amphotéricine B est fortement réduite en présence de la peroxyde dismutase et d'O₂ ou en absence d'O₂; nous pouvons supposer que l'amphotéricine B favorise la formation de radicaux libres d'O₂ responsables des peroxydations lipidiques et de la lyse cellulaire. De plus, l'induction de la perméabilité cellulaire aux cations ne serait aucunement influencée par la présence ou non d'O₂ (Figure N°06).

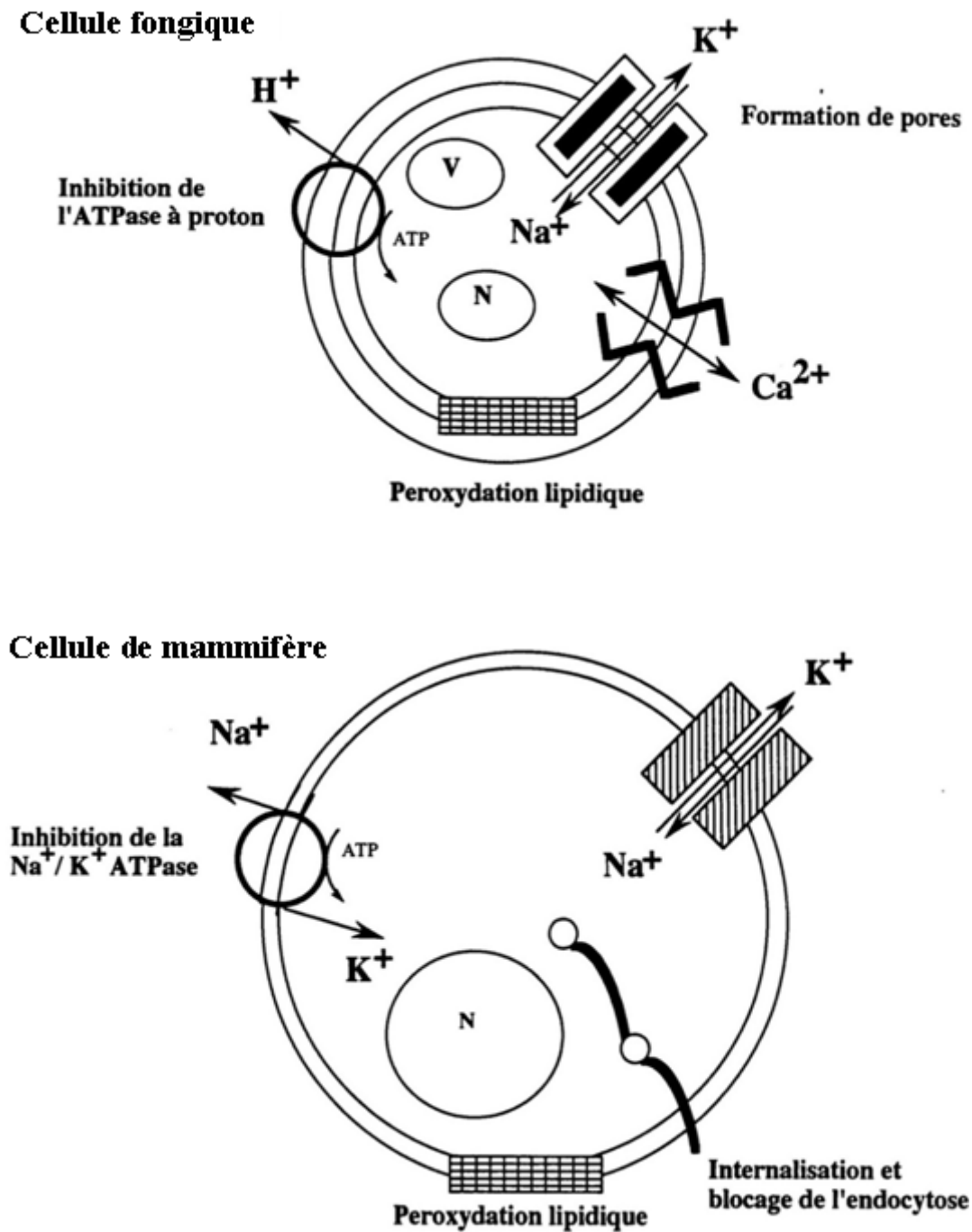


Figure N°06 : Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B (BRAJTBURG et BOLARD, 1996).

4. PEROXYDATION LIPIDIQUE DE L'AMPHOTERICINE B :

L'amphotéricine B reste l'antifongique le plus efficace dans le traitement des mycoses profondes et systémiques, mais sa toxicité élevée envers les cellules de mammifères limite son utilisation.

Cette toxicité est due partiellement à la peroxydation lipidique exercée par l'amphotéricine B au niveau des membranes cellulaires.

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine sont concernés.

In vivo, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important. Les membranes des cellules sont particulièrement riches en acides gras polyinsaturés (30 à 50 %) présents dans les phospholipides, les sphingolipides, les cardiolipides. La lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...) (CILLARD, 2006).

L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt dû aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé.

Selon GABORIAU et coll., (1997), les espèces réactives de l'oxygène produit par l'amphotéricine B sont impliquées dans la dégradation auto oxydative de la molécule, ainsi que dans son activité peroxydative au niveau des membranes cellulaires, ce qui explique la cytotoxicité de l'amphotéricine B, et que l'état d'agrégation de la molécule module la cinétique de l'auto oxydation d'amphotéricine B. Par contre, les formes monomériques et les superagrégats de l'amphotéricine B ne sont pas impliqués dans ce processus parce qu'elles sont plus stables.

D'autre part, l'oxygène des acides gras insaturés des phospholipides induit la fragilisation des membranes cellulaires, ce qui rend les cellules plus sensibles au choc osmotique (LAMY-FREUND et coll., 1991).

Cette observation a orienté les chercheurs vers le choix des antioxydants pour piéger les radicaux libres afin de protéger ou bien empêcher la propagation de ce mécanisme de dommage irréversible.

En effet ANDREWS et coll., (1977) ainsi que BEGGS et coll., (1977), ont montré que l'addition de quelques antioxydants (n-propyl gallate, hydroxyanisole butylé, hydroxytoluène butylé, acide nordihydroguaiarétique et l'acide D- α -tocopherol succinate) avec l'AmB permet de stabiliser la molécule d'AmB contre l'autodégradation afin de prolonger l'activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans*.

Par ailleurs, des études ont mis en évidence l'effet protecteur de certains antioxydants (catalase) contre le dommage oxydatif induit par l'amphotéricine B chez les érythrocytes humains (BRAJTBURG et coll., 1985), et chez les cellules fongiques (SOKOL-ANDERSON et coll., 1986).

C'est pourquoi, nous nous sommes proposé d'incorporer deux molécules antioxydantes (la vitamine C et la vitamine E) dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B afin d'étudier l'effet de ces vitamines sur l'activité fongitoxique de l'amphotéricine B.

De façon générale, les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Ils interviennent dans des mécanismes de défense contre les attaques des radicaux libres en protégeant les membranes des cellules (LACAN BIONOV, 2001).

Ce sont des molécules qui sont capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permettent de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres [(FONTAINE, 2002); (SATAM, 2007)].

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense contre les radicaux libres.

- **Un système de défense primaire** composé d'enzymes et de substances antioxydantes. Ces substances auront comme fonction d'empêcher l'initiation ou la propagation des réactions radicalaires.
- **Un système de défense secondaire** qui consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défense précédents (PINCEMAIL et coll., 1998 a).

Les antioxydants naturels sont des molécules exogènes, qu'on ne trouve pas spontanément dans l'organisme mais qui sont apportées par l'alimentation, exemple de la vitamine A, C et E, les polyphénols, le sélénium...

Contrairement aux enzymes antioxydants, une molécule antioxydante piège un seul radical libre, pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule antioxydante doit donc être régénérée par d'autres systèmes.

Par conséquent, on distingue les molécules qui peuvent piéger directement les radicaux libres organiques (vitamine E) et celles qui agissent de façon indirecte sur les radicaux libres (vitamine C) (PROBIOX, 2005).

Ces antioxydants peuvent agir contre la lipopéroxydation de deux façons : soit en protégeant les lipides cibles (les acides gras polyinsaturés ou AGPI) contre les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ERO), soit en empêchant la propagation de la lipopéroxydation une fois qu'un peroxyde d'acide gras (le radical acylperoxy) est apparu.

Dans le premier cas, ils fonctionnent comme des pièges à ERO (caroténoïdes, vitamine C, polyphénols). Dans le second cas, ils interrompent directement la chaîne de lipopéroxydation [α -tocophérol (vitamine E)] (**LEGER, 2006**).

Rappelons que les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, qui sont nécessaires à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent être fournies par l'alimentation.

Les besoins quotidiens en vitamines ne sont que de quelques fractions de microgrammes à quelques milligrammes. Ceci est dû au fait que la plupart agissent comme des coenzymes ou des cofacteurs au cours des réactions enzymatiques.

4.1. Vitamine C :

La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme. C'est un excellent piègeur des espèces oxygénées activées (EOA) qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation.

Cette molécule a une structure apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone. Les trois formes moléculaires les plus connus de vitamine C sont ; l'acide L-ascorbique, l'acide D-ascorbique et sa forme oxydée dite acide déshydroascorbique (DHA) (Figure N°07). En revanche, seule la forme L et le DHA possèdent une activité biologique (**BOURGEOIS, 2003**).

Aux concentrations physiologiques, la vitamine C est capable d'empêcher l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'EOA. Lors de son oxydation en acide déshydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée [(**PROBIOX, 2005**); (**TRIPATHI et coll., 2009**)]. (Figure N°08)

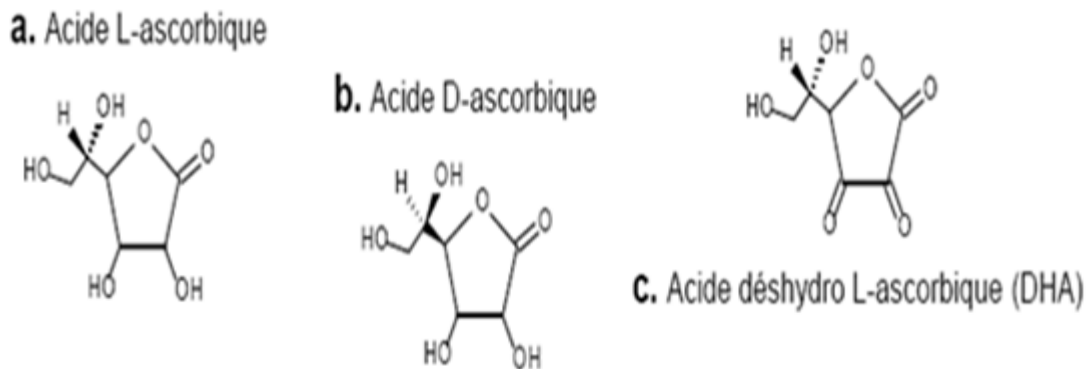


Figure N°07: Représentation de (a) l'acide L-ascorbique, (b) de l'acide D-ascorbique et (c) de l'acide déshydroascorbique présents dans les fruits et légumes (ROJAS GONZALEZ, 2007).

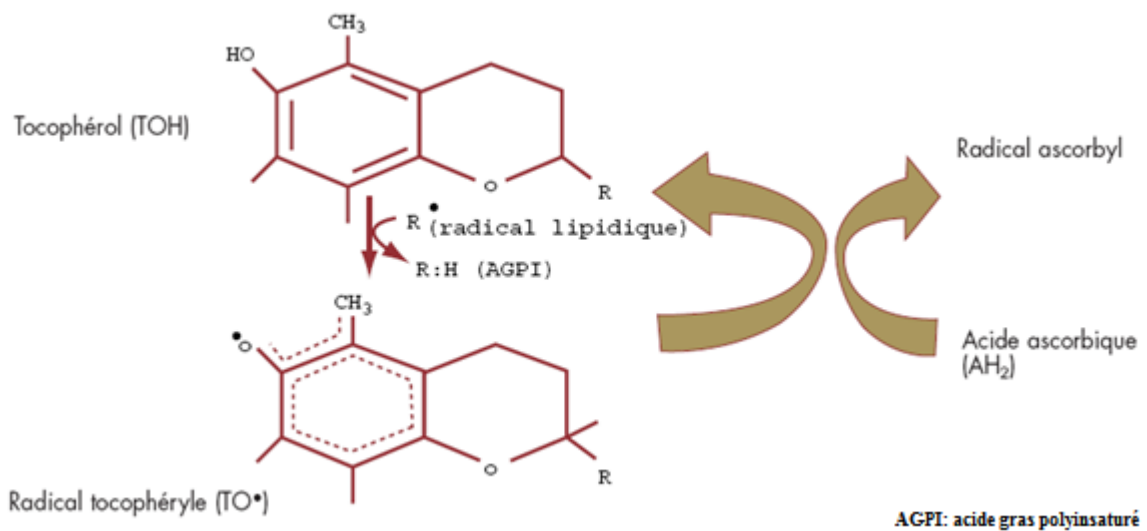


Figure N°08 : Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique (PINCEMAIL et coll., 1998 b).

Les fonctions de la vitamine C dans l'organisme sont très nombreuses et leurs études relèvent de la biologie, de la biochimie et de la médecine. Il est cependant possible de citer quelques exemples de son action.

- La vitamine C est nécessaire à l'élaboration du collagène, protéine constitutive des fibres des tissus conjonctifs. Elle participe donc à la formation mais surtout à la réparation des structures riches en ces tissus; os, cartilages, ligaments, vaisseaux sanguins (**NEU et coll., 1990**).
- Elle contribue à la santé des dents et gencives ;
- Elle favorise l'absorption intestinale du fer par l'intestin, permettant ainsi d'éloigner les risques d'anémie (**LE GRUSSE et WATIER, 1993**).
- Augmente la résistance aux infections: la vitamine C favorise la synthèse de l'interféron, substance responsable de la lutte contre l'invasion microbienne et virale de nos cellules.
- Nettoyant de l'organisme : la vitamine C favorise l'élimination d'agents polluants néfastes au bon fonctionnement de l'organisme, tels que les pesticides, les métaux lourds, les monoxydes de carbone, le dioxyde de soufre ainsi que toutes les toxines produites par notre corps.
- Elle agit par son pouvoir antioxydant dans la prévention du cancer en inhibant la formation de nitrosamines et radicaux libres.
- Elle favorise la synthèse de plusieurs hormones et neurotransmetteurs importants [**LE GRUSSE et WATIER, 1993**]; (**CHRISTOPHER, 2003**).

4.2. Vitamine E :

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (alpha, beta, gamma, delta). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (**PROBIOX 2005**). (Figure N°09)

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri-méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones.

Cette famille comprend 4 substances ; l' α -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol qui diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol [(**PINCEMAIL et coll. 1998 b**); (**CUVELIER et coll. 2003**)]. (Figure N°10)

La vitamine E ou α -tocophérol est un antioxydant puissant, qui joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les oxydations; peroxydation des acides gras polyinsaturés, des rétinoïdes et des carotènes, oxydation des fonctions thiols des protéines.

L' α -tocophérol agirait en captant les radicaux libres engendrés par les réactions d'oxydation, en particulier par la chaîne respiratoire des mitochondries (**RAISONNIER, 2002**).

En plus de son rôle antioxydant, la vitamine E joue de nombreux rôles dans l'organisme. On peut citer quelques exemples :

- Elle améliore la réponse immunitaire et protège contre les substances toxiques;
- Elle intervient également dans le bon équilibre général et le tonus musculaire et nerveux ;
- Elle diminue l'incidence du cancer de la prostate, du sein et du côlon et le risque des troubles visuels ;
- Elle joue un rôle déterminant dans la réparation de l'ADN ;
- Elle favorise une meilleure utilisation de l'insuline ;
- Elle aurait un effet bénéfique sur les maladies cardiovasculaires en limitant les effets néfastes du cholestérol et en intervenant sur le processus d'agrégation plaquettaire ;
- Elle ralentit l'évolution de la maladie d'Alzheimer et des états démentiels [(**LIVERNAIS-SAETTEL, 2000**); (**STOLARSKA, 2005**); (**BOHEMIER, 2010**)].

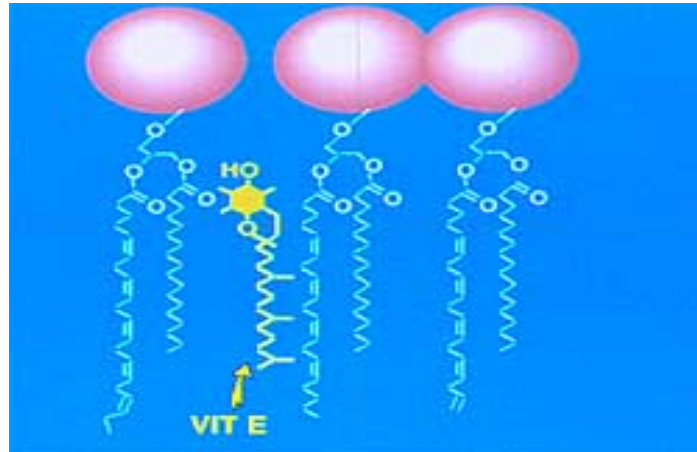


Figure N°09 : Insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique (PROBIOX, 2005).

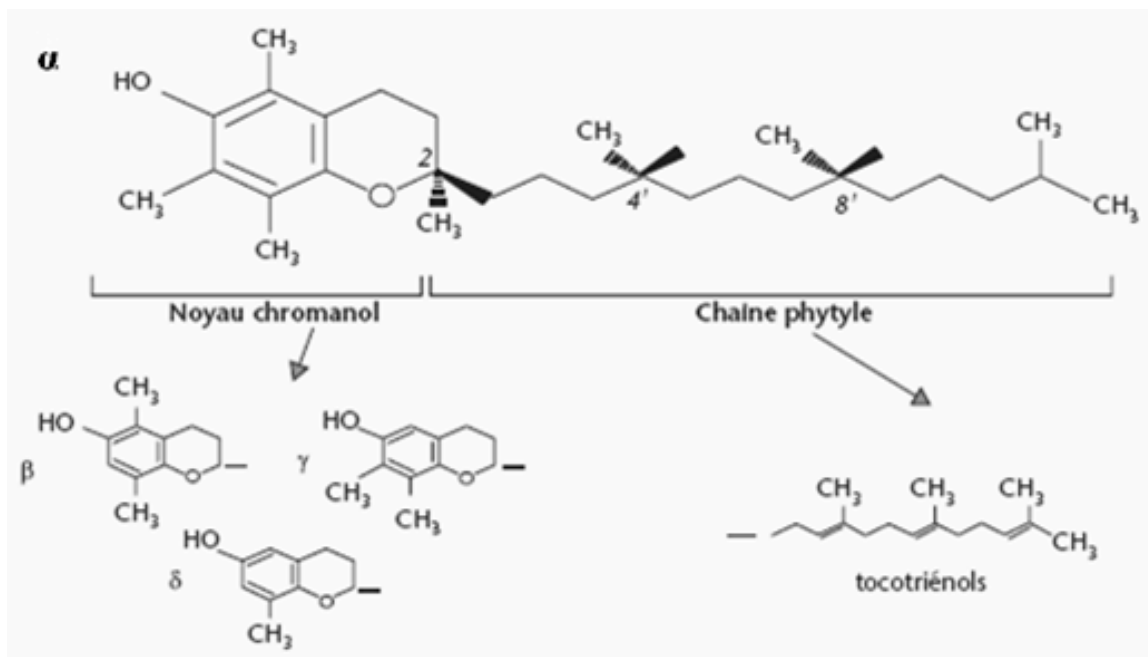


Figure N°10: Structure chimique des différents tocophérols (LEGER, 2006)

Deuxième partie: Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

1. Matériel :

1.1. Antifongique :

Nous avons utilisé de l'amphotéricine B pure provenant des laboratoires Bristol-Meyers-Squibb France.

La solution mère d'antifongique est préparée en extemporanée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10^{-3} M puis ajustée à 10^{-4} M au spectrophotomètre à 416 nm selon la formule $A = \epsilon Cl$ ($\epsilon_{416} = 121\ 400$)

1.2. Vitamines :

Nous avons utilisé deux vitamines :

- Acide ascorbique « vitamine C » en poudre blanche, pureté : 99 % (Fluka),
- Acide tocophérol « vitamine E » sous forme d'un liquide très visqueux, pureté $\geq 97\%$ (Fluka).

Les vitamines sont préparées en extemporané dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et ajoutées au milieu de culture au temps zéro à une concentration finale de 1,4mM pour la vitamine C et 8×10^{-3} mM pour la vitamine E. Le choix de ces concentrations est lié au pouvoir antioxydant de chaque vitamine [(ATMACA et ÇIÇEK, 1996) ; (ANDREWS et coll., 1977)].

1.3. *Candida albicans*:

Les expériences ont été menées sur une souche de levure, il s'agit de *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD., USA.).

Les levures sont entretenues par repiquages réguliers et successifs sur milieu Sabouraud gélosé et conservées à 4°C.

1.4. Globules rouges humains :

Les tests de cytotoxicité de nos formulations, ont été effectués sur le globule rouge humain, (modèle universel des membranes cellulaires animales), provenant d'un donneur unique sain.

2. Méthodes :

2.1. Détermination de l'activité antifongique en milieu liquide (*time-kill curve*):

Les cultures sont menées dans des Erlens Meyer de 250ml.

Les milieux de cultures sontensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 18 heures puis mis dans un incubateur de paillasse (*Thermo Forma Orbital Shaker*) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute.

La concentration cellulaire de départ est fixée à 2.10^6 cellules/ml.

Pour étudier le phénomène de dormance des levures, la croissance est suivie sur une période de 40 heures.

La mesure de la croissance est réalisée par dénombrement des levures sur cellule de Thoma depuis le temps zéro qui correspond à l'addition de l'inoculum, des vitamines et de l'antifongique.

2.2. Etude microscopique :

Pour vérifier la viabilité des cellules par rapport à leur forme structurale au cours de la croissance, nous avons utilisé le microscope électronique à balayage (laboratoire de microscopie du département de physique -Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen-).

2.2.1. Mode opératoire :

Les cultures de *Candida albicans* sont menées dans le Sabouraud liquide en ajoutant nos formulations.

Nous avons lancé la croissance dans des tubes qui contiennent 10ml du milieu aux concentrations finales suivantes : - Amphotéricine B (0,4 μ M qui correspond à la CMI vis-à-vis à cette souche)

- Vitamine C (1,4mM)

- Vitamine E (8x10⁻³mM)

Nous avons réalisé des prélèvements en fixant une goutte sur une lamelle par la chaleur. Après coloration au bleu de méthylène et séchage des frottis nous avons maintenu ces derniers dans des boîtes de Pétri avant l'observation microscopique selon les recommandations de Guezlane et coll., (2008).

Le microscope électronique à balayage utilisé est un HITACHI TM-1000. Il fonctionne en mode "pression contrôlée". Il fait l'observation d'échantillons fins, massifs, secs, gras, hydratés, sans préparation préalable avec un agrandissement possible jusqu'à x10.000 (**HELLOPRO 2010**).

2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Nous avons utilisé la méthode décrite en 2008 par the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. C'est la méthode de référence pour la détermination des CMI et des CMF.

Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institut*) (*Sigma*) supplémenté de 2% de glucose et du rouge phénol comme indicateur coloré de pH. Ce milieu est tamponné à pH 7. C'est un milieu enrichi supplémenté en acide aminé, qui permet une meilleure croissance des levures.

La concentration cellulaire finale est fixée à 5 x 10⁵ cellules/ml.

Pour la culture en microplaque, nous avons préparé des solutions mères d'antifongiques dans le DMSO à des concentrations allant de 3,12 mM à 1600 mM. Ces dernières sont diluées au 1/100 dans le milieu RPMI.

Pour étudier l'effet des vitamines C (1,4mM) et E (8×10^{-3} mM) sur l'efficacité de l'amphotéricine B, nous avons déposé dans chaque puits de la microplaque 50 μ l de la solution antifongique et 50 μ l de la solution vitaminique puis nous avons ajouté 100 μ l de la suspension de levure dans chaque puits (Figure N°11).

Il est à noter que le puits N°11 correspond à la culture témoin (cellules cultivées en absence d'amphotéricine B et des vitamines). Le puits N°12 quand à lui sert de témoin négatif.

La microplaque ainsi préparée est scellée puis placée dans une étuve à 35°C pendant 24 heures.

Avant la lecture de la microplaque, nous avons ajouté 10 μ l d'un indicateur de croissance ou de viabilité des levures, il s'agit du tétrazolium [MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium bromide (Sigma)]. Le MTT est préparé en extemporané à une concentration de 0,4 mg/ml dans de l'eau physiologique stérile. La microplaque est réincubée à 35°C pendant 30 minutes. Les puits où une croissance a eu lieu présentent une couleur bleue violette.

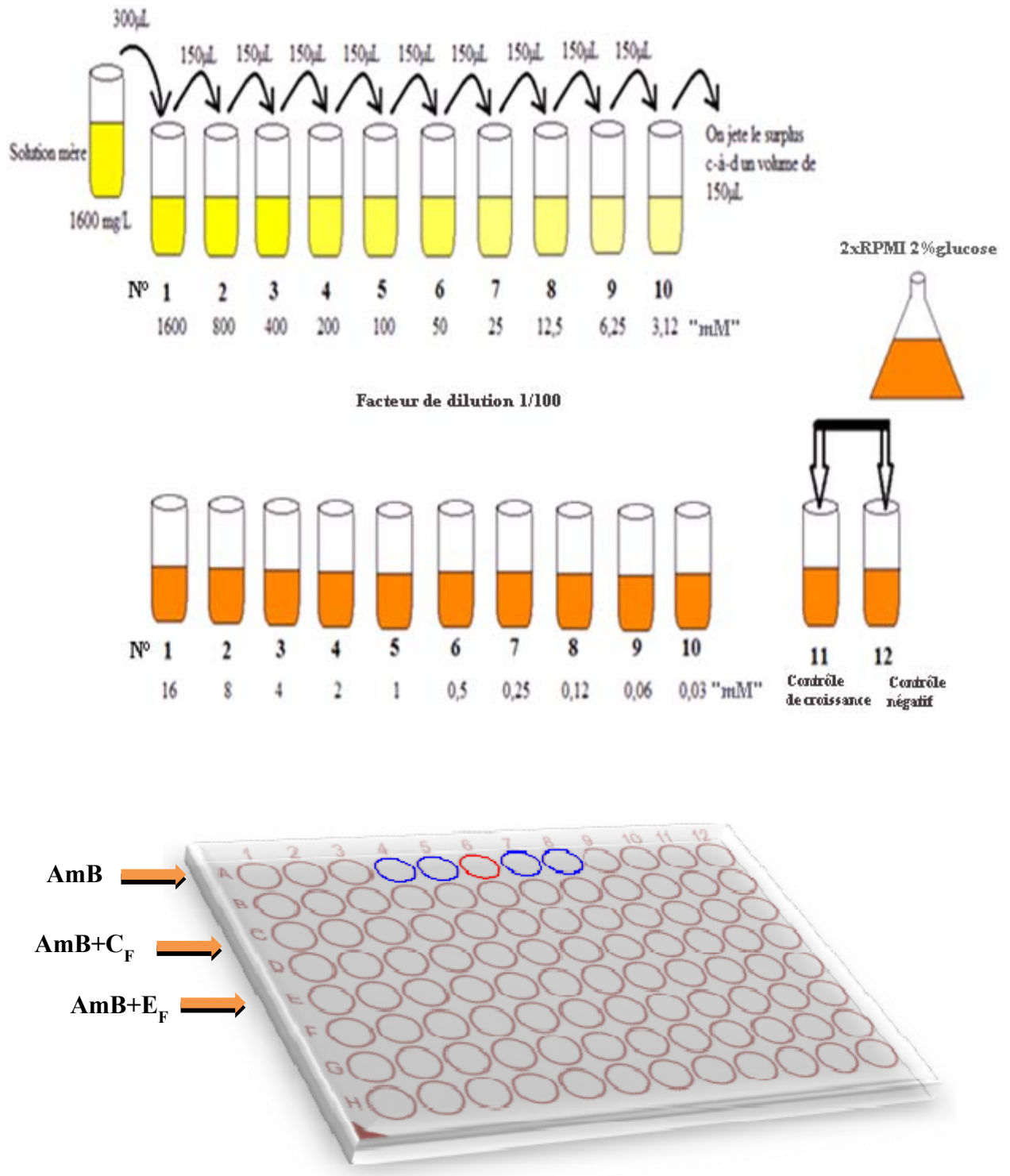


Figure N°11 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur la microplaque

2.4. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par Espinel-Ingroff et coll., (2002). Cette méthode est en accord avec les exigences de la NCCLS «*The National Committee for Clinical Laboratory Standards*».

La concentration minimale fongicide (CMF) correspond à la concentration minimale d'antifongique capable d'éliminer plus de 90% des agents pathogènes, après 24 ou 48 heures d'incubation.

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les puits qui montrent une inhibition complète (100% inhibés ou claire) contenant les concentrations en substance antifongique strictement supérieures à la CMI vont servir à la détermination de la CMF.

Pour cela, 20µl de chacun de ces puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Sabouraud gélosé. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35°C pendant 48 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondante à la CMF renferme un nombre de colonie inférieure à 3.

2.5. Etude de la toxicité de nos formulations vis à vis des globules rouges humains :

2.5.1. Préparation de la suspension érythrocytaire :

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec une solution de lavage glacée MgCl₂ (2 mM) NaCl (150mM) puis suspendu à nouveau dans le tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10mM, pH 7,4.

2.5.2. Préparation des solutions antifongiques :

Pour la préparation des solutions antifongiques, nous avons utilisé :

- L'amphotéricine B à une concentration finale égale à 20µM (environ 20 fois la CMI) afin d'obtenir une hémolyse.
- La vitamine C est utilisée à une concentration finale de 1,4 mM.
- La vitamine E est utilisée à une concentration finale de 8×10^{-3} mM.

Les solutions ainsi préparées sont gardées à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 minutes avant leur utilisation pour assurer une meilleure stabilité et une bonne solubilisation de l'amphotéricine B.

2.5.3. Evaluation de la toxicité de nos formulations vis à vis des globules rouges humains :

Les globules rouges sont suspendus dans du tampon isotonique PBS 10mM, pH 7,4 à raison de 4000 cellules/ml.

La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 120 minutes, dès l'addition de la solution antifongique à une concentration finale de 20µM.

Des prélèvements de 500µl à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalles réguliers. A ces prises d'essai, nous ajoutons 2ml d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes sur centrifugeuse JOUAN, nous récupérons le surnageant sur lequel l'hémoglobine est dosée par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 548 nm.

Troisième partie: Résultats et discussion

Ce travail est réparti en deux volets, car nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antifongique de l'amphotéricine B en présence des antioxydants naturels, parmi ces derniers nous avons choisis la vitamine C « acide ascorbique » et la vitamine E « α tocophérol ». L'apparition des effets secondaires sévères suivis d'un traitement par l'Amphotéricine B nous a poussés aussi à évaluer la cytotoxicité de nos formulations en présence des deux vitamines sur les globules rouges humains.

1. Evaluation de l'activité antifongique :

Dans cette partie, nous avons utilisé deux techniques pour l'évaluation quantitative de l'activité antifongique de l'amphotéricine B en l'absence et en présence des deux vitamines :

- Détermination de l'activité antifongique sur milieu liquide (*time-kill curve*).
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF).

1.1. Détermination de l'activité antifongique sur milieu liquide (*time-kill curve*):

1.1.1. Effet de l'addition de la vitamine C :

La Figure N°12 regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'addition de la vitamine C (1,4mM) sur l'activité antifongique de l'AmB (0,4 μ M) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231.

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Les levures passent par une phase de latence de 2 heures caractérisée par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle par six générations successives.
Le nombre de cellules augmente pour atteindre un maximum au bout de 8 heures d'incubation. Ce taux reste inchangé durant une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation à 30° C sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de la vitamine C sur la croissance de *Candida albicans*. Les cultures menées en présence de vitamine C (1,4mM) donnent des croissances similaires à la culture témoin.
- La courbe (c) représente l'effet de l'amphotéricine B sur la croissance de *Candida albicans*. Nous remarquons un prolongement de la phase de latence. Cette dernière passe de 2 heures en absence d'antifongique jusqu'à 24 heures en présence de 0,4 μ M d'Amphotéricine B. Ensuite, les cellules reprennent leur croissance d'une manière similaire aux cellules témoins pour atteindre un maximum de croissance égale à $57,5 \times 10^6$ cellules/ml qui correspond à un degré d'inhibition de 42,5 %.

- La courbe (d) représente l'effet de l'addition de la vitamine C sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231. Nous remarquons un décalage de temps en phase de latence qui passe de 24 heures à 27 heures. En phase stationnaire la charge cellulaire atteint un maximum de croissance inférieur par rapport à l'amphotéricine B seule égal à 51×10^6 cellules/ml qui correspond à un degré d'inhibition de 49%.

Il ressort de ce résultat que le milieu réactionnel d'amphotéricine B ($0,4 \mu\text{M}$) supplémenté de vitamine C à concentration finale de $1,4 \text{mM}$, augmente l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 de 6,5%. Cela est dû au pouvoir antioxydant de la vitamine C qui confère une protection contre l'autoxydation de la molécule d'amphotéricine B. Ce résultat va dans le même sens que celui d'ATMACA et ÇIÇEK (1996).

Le prolongement de la durée d'incubation au-delà de 24h, provoque un ressuscitemment d'un certain nombre de cellules.

En effet, le pourcentage des cellules qui ressuscitent est estimé à 57,5% en présence d'AmB seule avec une phase de latence de 24h et à 51% en présence du complexe AmB-Vit C avec une phase de latence de 27h.

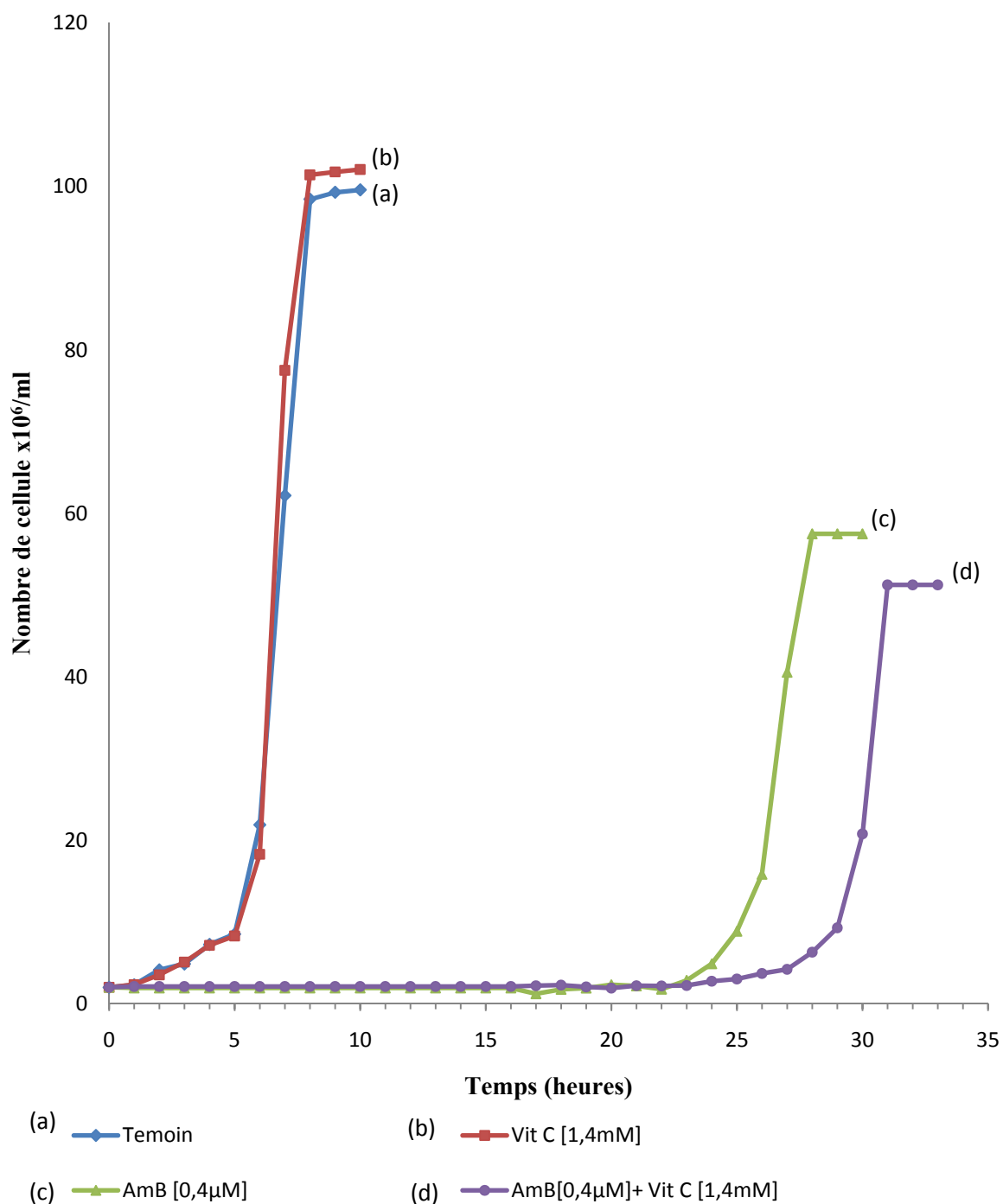


Figure N°12 : Effet de l'addition de la vitamine C (1,4mM) sur l'activité antifongique de l'AmB (0,4µM) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

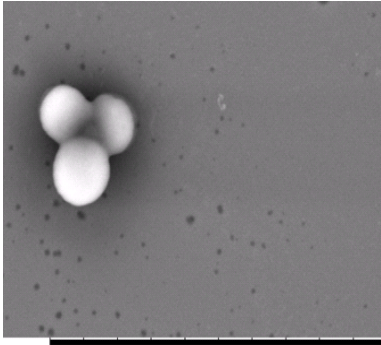
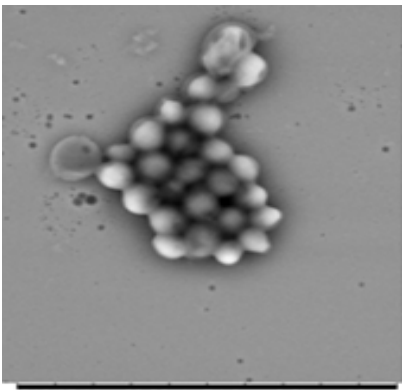
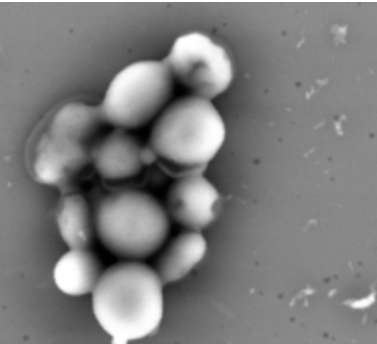
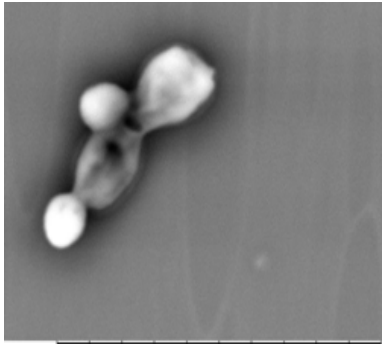
Les photos N°01 (a) et (b) correspondent aux changements structuraux de *C. albicans* mise en culture en absence de toute addition (culture témoin).

Nous remarquons qu'en phase de latence (photo N°01 a) les changements structuraux sont marqués par l'augmentation de la taille des cellules et l'apparition de l'état de bourgeonnement. Cet état bourgeonnant se généralise avec la présence de quelques agrégats cellulaires, lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance (photo N°01 b).

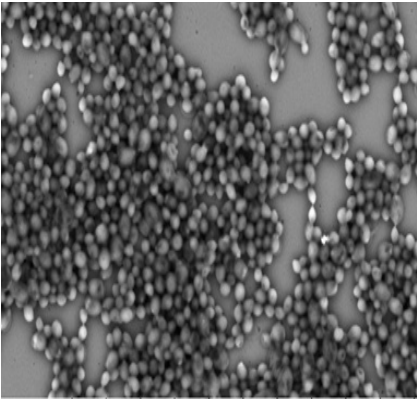
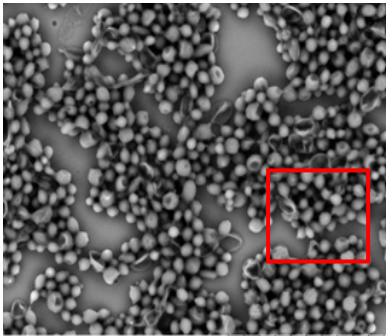
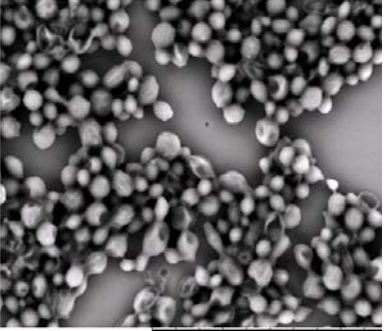
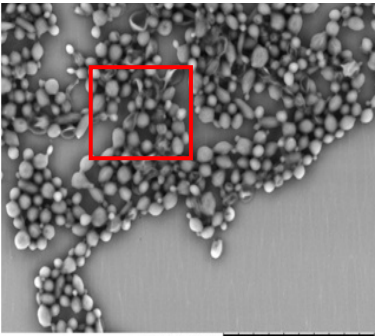
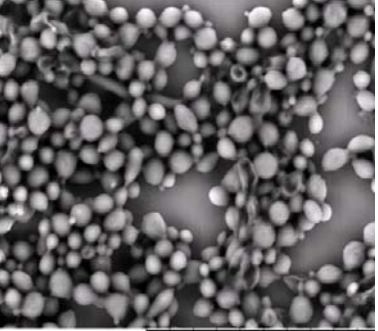
Les photos N°01 (c) et (d) correspondent aux changements structuraux au cours de la croissance de *C. albicans* en présence d'AmB et de la vitamine C à la fin de la phase de latence. Pour les levures cultivées en présence d'AmB seule (photo N°01 c) ou en présence d'AmB-Vit C (photo N°01 d), nous remarquons après 18 heures d'incubation (ce qui correspond à la fin de la phase de latence) une augmentation de la taille des cellules.

Les photos N°02 (b), (c), (d) et (e) correspondent aux changements structuraux au cours de la croissance de *C. albicans* en présence d'AmB et de la vitamine C pendant la phase stationnaire.

Après 36 heures (ce qui correspond à la phase stationnaire) nous observons un éclatement des cellules de *C. albicans* cultivées en présence d'AmB seule (photos N°02 b et c). Alors qu'en présence de AmB-Vit C (photos N°02 d et e) non seulement il y a lyse mais aussi une nette diminution de la charge cellulaire.

Témoin	AmB seule	AmB- Vit C
<p>(a)</p>  <p>2010/07/06 11:07 L D1,9 x5,0k 20 um</p> <p>(b)</p>  <p>2010/07/06 09:20 L D1,9 x3,0k 30 um</p>	<p>(c)</p>  <p>2010/07/06 09:38 L D1,9 x5,0k 20 um</p>	<p>(d)</p>  <p>2010/07/06 09:57 L D1,9 x5,0k 20 um</p>
<p><i>C. albicans</i> sans aucune addition (a) En phase de latence; (b) En phase exponentielle.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4µM] à la fin de la phase de latence.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4 µM] et Vit C [1,4mM] à la fin de la phase de latence.</p>

Photos N°01 : Changements structuraux de *Candida albicans* ATCC10231 en l'absence et en présence d'antifongique et de la vitamine C à la fin de la phase de latence.

Témoin	AmB seule	AmB- Vit C
<p>(a)</p>  <p>2010/07/06 09:24 L D1,9 x1,0k 100 um</p>	<p>(b)</p>  <p>2010/07/07 09:17 L D2,0 x1,2k 50 um</p> <p>(c)</p>  <p>2010/07/07 09:19 L D2,0 x1,8k 50 um</p>	<p>(d)</p>  <p>2010/07/07 09:27 L D1,9 x1,2k 50 um</p> <p>(e)</p>  <p>2010/07/07 09:30 L D1,9 x1,8k 50 um</p>
<p><i>C. albicans</i> sans aucune addition à la fin de la phase stationnaire.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4μM] pendant la phase stationnaire.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4 μM] et Vit C [1,4mM] pendant la phase stationnaire.</p>

Photos N°02 : Changements structuraux de *Candida albicans* ATCC10231 en l'absence et en présence d'antifongique et de la vitamine C pendant la phase stationnaire.

1.1.2. Effet de l'addition de la vitamine E :

La Figure N°13 regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'addition de la vitamine E (8×10^{-3} mM) sur l'activité antifongique de l'AmB ($0,4 \mu\text{M}$) vis-à-vis de *Candida albicans*.

- La courbe (a) représente la culture témoin à 100% de croissance.
- La courbe (b) représente l'effet de la vitamine E sur la croissance de *Candida albicans*. Les cultures menées en présence de vitamine E (8×10^{-3} mM) donnent des croissances similaires à la culture témoin.
- La courbe (c) représente l'effet de l'amphotéricine B sur la croissance de *Candida albicans*. Nous remarquons un prolongement de la phase de latence. Cette dernière passe de 2 heures en absence d'antifongique jusqu'à 24 heures en présence de $0,4 \mu\text{M}$ d'Amphotéricine B. Ensuite, les cellules reprennent leur croissance d'une manière similaire aux cellules témoins pour atteindre un maximum de croissance égale à $54,5 \times 10^6$ cellules/ml qui correspond à un degré d'inhibition de 45,5 %.
- La courbe (d) représente l'effet de l'addition de la vitamine E sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis *Candida albicans*. Nous remarquons un décalage de temps dans la phase de latence qui passe de 24 heures à 27 heures. En phase stationnaire la charge cellulaire atteint un maximum de croissance inférieur par rapport à l'amphotéricine B seul égal à $42,5 \times 10^6$ cellules/ml qui correspond à un degré d'inhibition de 57,5%.

Il ressort de ce résultat que le milieu réactionnel d'amphotéricine B ($0,4 \mu\text{M}$) supplémenté de vitamine E à concentration finale de 8×10^{-3} mM, augmente l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 de 12%. Cela est dû au pouvoir antioxydant de la vitamine E qui confère une protection contre l'autoxydation de la molécule d'amphotéricine B. Ce résultat va dans le même sens que celui d'ANDREWS et coll., (1977).

Le prolongement de la durée d'incubation au-delà de 24h, provoque un ressuscitements d'un certain nombre de cellules.

En effet, le pourcentage des cellules qui ressuscitent est estimé à 54,5% en présence d'AmB seule avec une phase de latence de 24h et à 42,5% en présence du complexe AmB-Vit E avec une phase de latence de 27h.

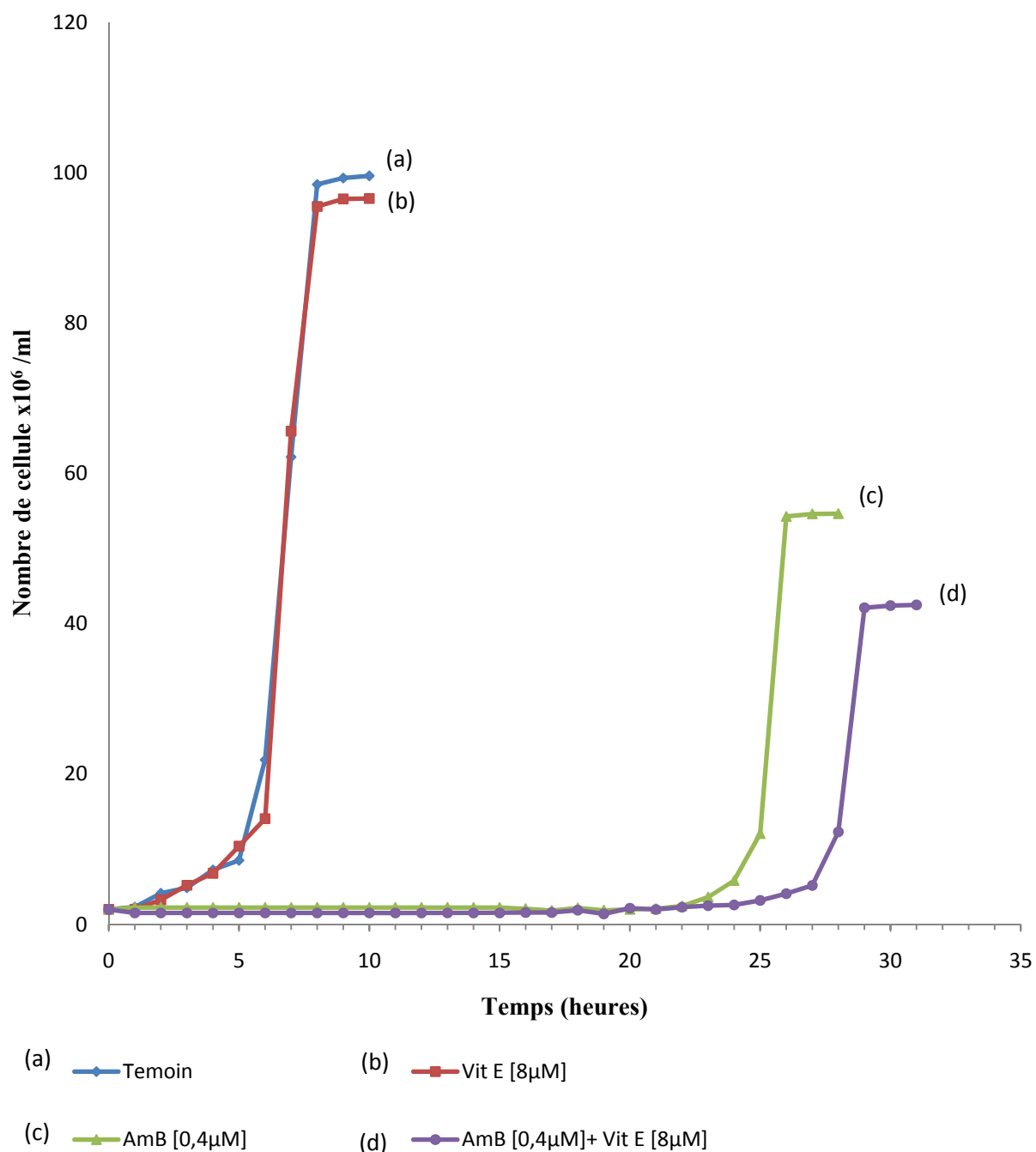


Figure N°13 : Effet de l'addition de la vitamine E sur l'activité antifongique de l'amphoéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231.

Les photos N°03 (a) et (b) correspondent aux changements structuraux de *C. albicans* mise en culture en absence de toute addition (culture témoin).

En absence de toute addition (culture témoin), nous remarquons qu'en phase de latence (photo N°03a) les changements structuraux sont marqués par l'augmentation de la taille des cellules et l'apparition de l'état de bourgeonnement. Cet état bourgeonnant se généralise avec la présence de quelques agrégats cellulaires, lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance (photo N°03 b).

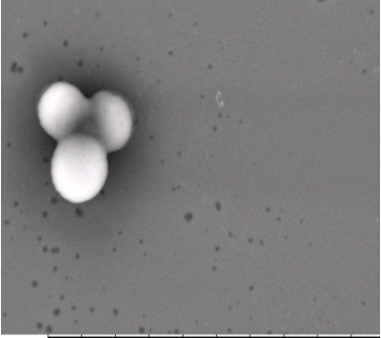
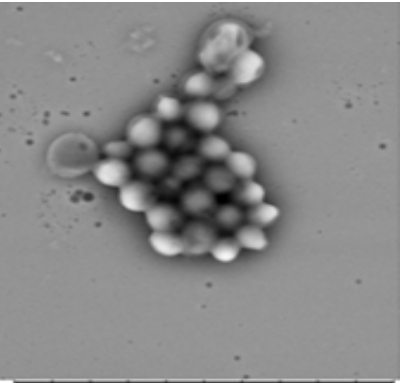
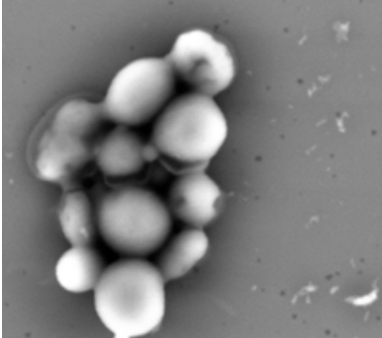
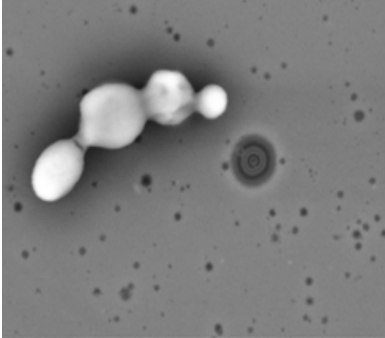
Les photos N°03 (c) et (d) correspondent aux changements structuraux au cours de la croissance de *C. albicans* en présence d'AmB et de la vitamine E à la fin de la phase de latence.

Pour les levures cultivées en présence d'AmB seule (photo N°03 c) ou en présence d'AmB-Vit E (photo N°03 d), nous remarquons après 18 heures d'incubation (ce qui correspond à la fin de la phase de latence) une augmentation de la taille des cellules.

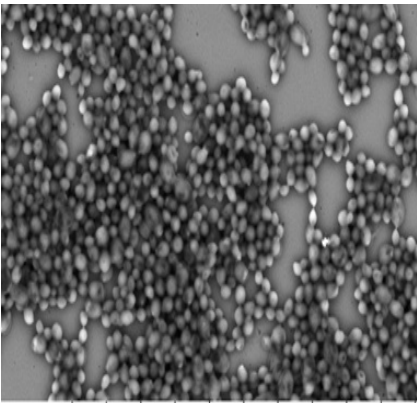
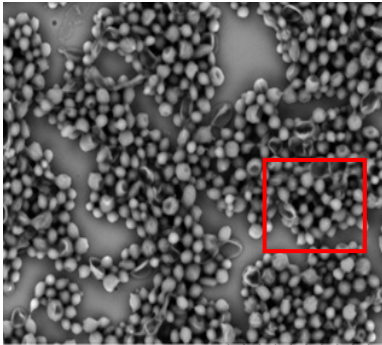
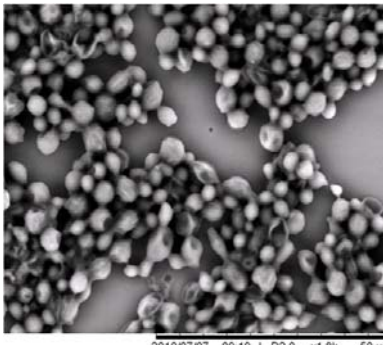
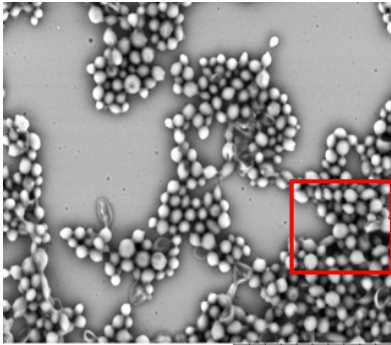
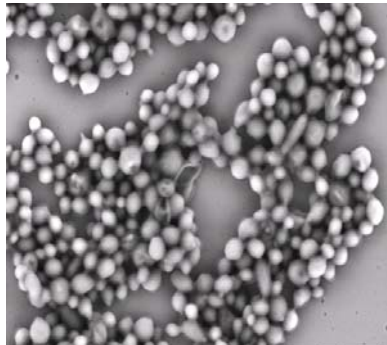
Les photos N°04 (b), (c), (d) et (e) correspondent aux changements structuraux au cours de la croissance de *C. albicans* en présence d'AmB et de la vitamine E pendant la phase stationnaire.

Après 36 heures (ce qui correspond à la phase stationnaire) nous observons un éclatement des cellules de *C. albicans* cultivées en présence d'AmB seule (photos N°04 b et c).

Alors qu'en présence de AmB-Vit E (photos N°04 d et e) non seulement il y a lyse mais aussi une nette diminution de la charge cellulaire.

Témoin	AmB seule	AmB- Vit E
<p>(a)</p>  <p>(b)</p> 	<p>(c)</p> 	<p>(d)</p> 
<p><i>C. albicans</i> sans aucune addition (a) <i>En phase de latence</i>; (b) <i>En phase exponentielle</i>.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4µM] à la fin de la phase de latence.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4 µM] et Vit E [8x10⁻³mM] à la fin de la phase de latence.</p>

Photos N°03 : Changements structuraux de *Candida albicans* ATCC10231 en l'absence et en présence d'antifongique et de la vitamine E à la fin de la phase de latence.

Témoin	AmB seule	AmB- Vit E
<p>(a)</p>  <p>2010/07/06 09:24 L D1,9 x1,0k 100 um</p>	<p>(b)</p>  <p>2010/07/07 09:17 L D2,0 x1,2k 50 um</p> <p>(c)</p>  <p>2010/07/07 09:19 L D2,0 x1,8k 50 um</p>	<p>(d)</p>  <p>2010/07/07 09:39 L D1,9 x1,2k 50 um</p> <p>(e)</p>  <p>2010/07/07 09:41 L D1,9 x1,8k 50 um</p>
<p><i>C. albicans</i> sans aucune addition à la fin de la phase stationnaire.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4μM] pendant la phase stationnaire.</p>	<p><i>C. albicans</i> en présence d'AmB [0,4 μM] et Vit E [8x10⁻³mM] pendant la phase stationnaire.</p>

Photos N°04 : Changements structuraux de *Candida albicans* ATCC10231 en l'absence et en présence d'antifongique et de la vitamine E pendant la phase stationnaire.

Selon les résultats obtenus à ce niveau de l'étude, sous l'action de l'amphotéricine B en absence ou présence des vitamines (C ou E) les levures de *C. albicans* ATCC 10231, perdent leurs constituants cellulaires et finissent par mourir. Néanmoins, un certain nombre de ces cellules échappe à l'effet toxique de cette drogue. Ces cellules capables de ressusciter si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 24 heures sont dites selon BOUCHERIT et coll., (2007), des cellules dormantes.

En fait, la dormance a été définie comme un état réversible de basse activité, dans lequel des cellules peuvent persister pendant des périodes prolongées sans division (**KAPRELYANTS et KELL, 1993**). Cependant, le phénomène de la dormance des levures n'a été mis en évidence que depuis relativement peu de temps, et il est encore mal connu.

Les questions concernant le réveil de la dormance sont à prendre en compte s'il résulte de la production par des cellules d'un facteur de survie qui stimule la renaissance des cellules dormantes (**ARSENY et coll., 1994**), ou s'il est la conséquence du rétablissement des dommages induits par l'amphotéricine B au niveau de la membrane des cellules comme il a été montré pour les cellules des mammifères (**BINET et BOLARD, 1988**).

Par ailleurs, nous constatons une meilleure activité de l'amphotéricine B en ajoutant les vitamines C et E, ce qui est probablement due principalement au pouvoir antioxydant de ces derniers.

En comparant les degrés d'inhibition de l'amphotéricine B associée aux vitamines (6,5% pour la vitamine C et 12% pour la vitamine E), nous remarquons que l'activité antifongique en présence de la vitamine E est deux fois plus importante qu'en présence de la vitamine C, ce qui est probablement lié au fait que selon CURTAY et ROBIN, (2000) le pouvoir antioxydant de la vitamine E est plus élevé que celui de la vitamine C.

Il semblerait alors que l'activité de l'amphotéricine B est liée directement et parallèlement au pouvoir antioxydant des vitamines.

1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF):

La sensibilité de *Candida albicans* vis-à-vis de l'antifongique en présence et en absence des vitamines a été évaluée selon la méthode européenne EUCAST. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau N°01.

L'addition de la vitamine C ou de la vitamine E dans le milieu de culture permet une réduction de la CMI et de la CMF d'un facteur de 4. Elles passent de 0,4 μ M (AmB seule) à 0,12 μ M (AmB-Vit) pour la CMI, et de 1 μ M (AmB seule) à 0,25 μ M (AmB-Vit) pour la CMF.

Il est à noter que le rapport CMI/CMF=2 quelque soit la formulation utilisée (AmB seule ou AmB-Vit), ce qui selon FAUCHER et AVRIL (2002), correspond à une action fongicide.

Il est à noter que les cellules ayant subi l'action de la CMF durant 48 heures d'incubation, ne sont plus cultivable par la suite.

Tableau N°01: CMI et CMF de l'AmB en l'absence et en présence des vitamines.

	CMI (μ M)	CMF (μ M)
AmB	0,5	1
AmB en présence Vit C _F	0,12	0,25
AmB en présence Vit E _F	0,12	0,25

2. Etude de la toxicité de nos formulations vis à vis des globules rouges humains :

Pour les tests de cytotoxicité de l'amphotéricine B, les expériences ont été menées sur le globule rouge humain.

Lorsque la membrane plasmique du globule rouge est altérée par l'action de l'amphotéricine B, il s'ensuit une lyse qui se traduit par la libération d'hémoglobine chez le globule rouge ; c'est pourquoi nous avons dosé le taux d'hémoglobine extracellulaire avant et après l'addition des vitamines.

L'amphotéricine B est utilisée à une concentration de $20\mu\text{M}$ (20 fois la CMF) et les vitamines C et E sont ajoutées au milieu réactionnel à $1,4\text{mM}$ et à $8 \times 10^{-3}\text{mM}$ respectivement.

L'antifongique et les vitamines sont additionnées au milieu réactionnel au même moment que les cellules ce qui correspond au temps zéro des expériences.

La figure N°14 représente l'effet de l'addition de la vitamine C à l'AmB sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente la courbe contrôle de la vitamine C. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'AmB à $20\mu\text{M}$. Les globules rouges perdent près de 22% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation et près de 73% après 15 minutes d'incubation. Cette perte est autour de 85% après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution d'AmB ($20\mu\text{M}$) en présence de la vitamine C à une concentration finale de $1,4\text{mM}$. Les globules rouges perdent près de 22% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation et près de 61% après 15 minutes de contact. Ce taux est inférieur à celui de l'amphotéricine B seule. A la fin de l'expérience, le taux d'hémoglobine extracellulaire atteint un maximum de 69% qui est nettement inférieur à celui de l'amphotéricine B seule (85%).

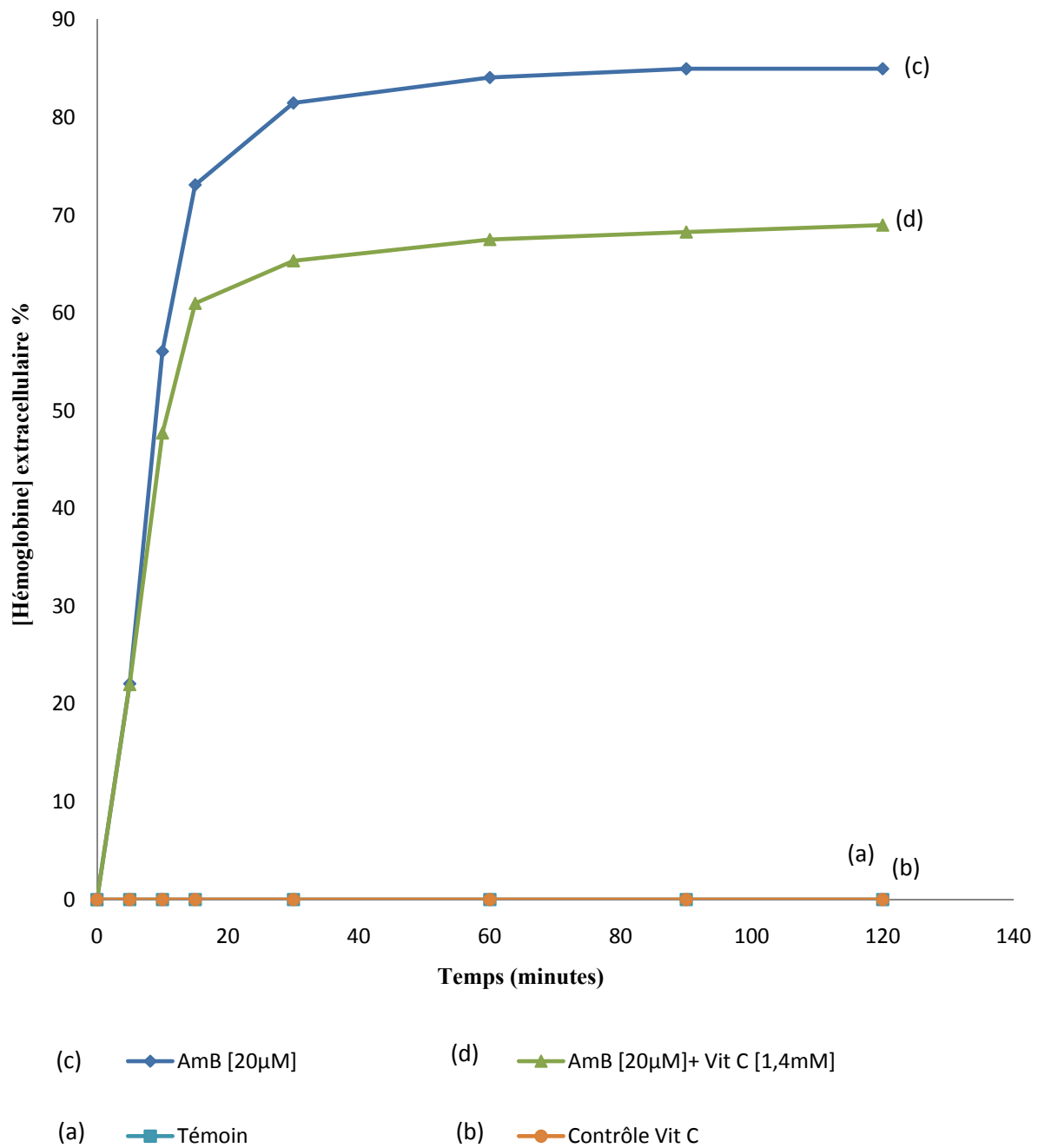


Figure N°14 : Effet de la vitamine C additionnée à l'AmB sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les érythrocytes.

La figure N°15 représente l'effet de l'addition de la vitamine E sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition d'AmB. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente la courbe contrôle de la vitamine E. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'AmB préparé à concentration finale de $20\mu\text{M}$. Les globules rouges perdent près de 85% de leur hémoglobine après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution d'AmB ($20\mu\text{M}$) en présence de la vitamine E à une concentration finale de $8 \times 10^{-3} \text{mM}$. Les globules rouges perdent près de 21% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation et près de 59% après 15 minutes de contact. Ce taux est inférieur à celui de l'amphotéricine B seule. A la fin de l'expérience, le taux d'hémoglobine extracellulaire atteint un maximum de 67% qui est nettement inférieur à celui de l'amphotéricine B seule (85%).

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la solution d'AmB ($20\mu\text{M}$) induit une libération massive de l'hémoglobine 85% après 60 minutes d'incubation. D'autre part, en présence de la vitamine C ($1,4\text{mM}$) la vitamine E ($8 \times 10^{-3} \text{mM}$) la perte d'hémoglobine n'est que de 69% et 67% respectivement. Il semble qu'il ya une protection du globule rouge contre la toxicité de l'AmB qui serait due fort probablement au pouvoir antioxydant des vitamines.

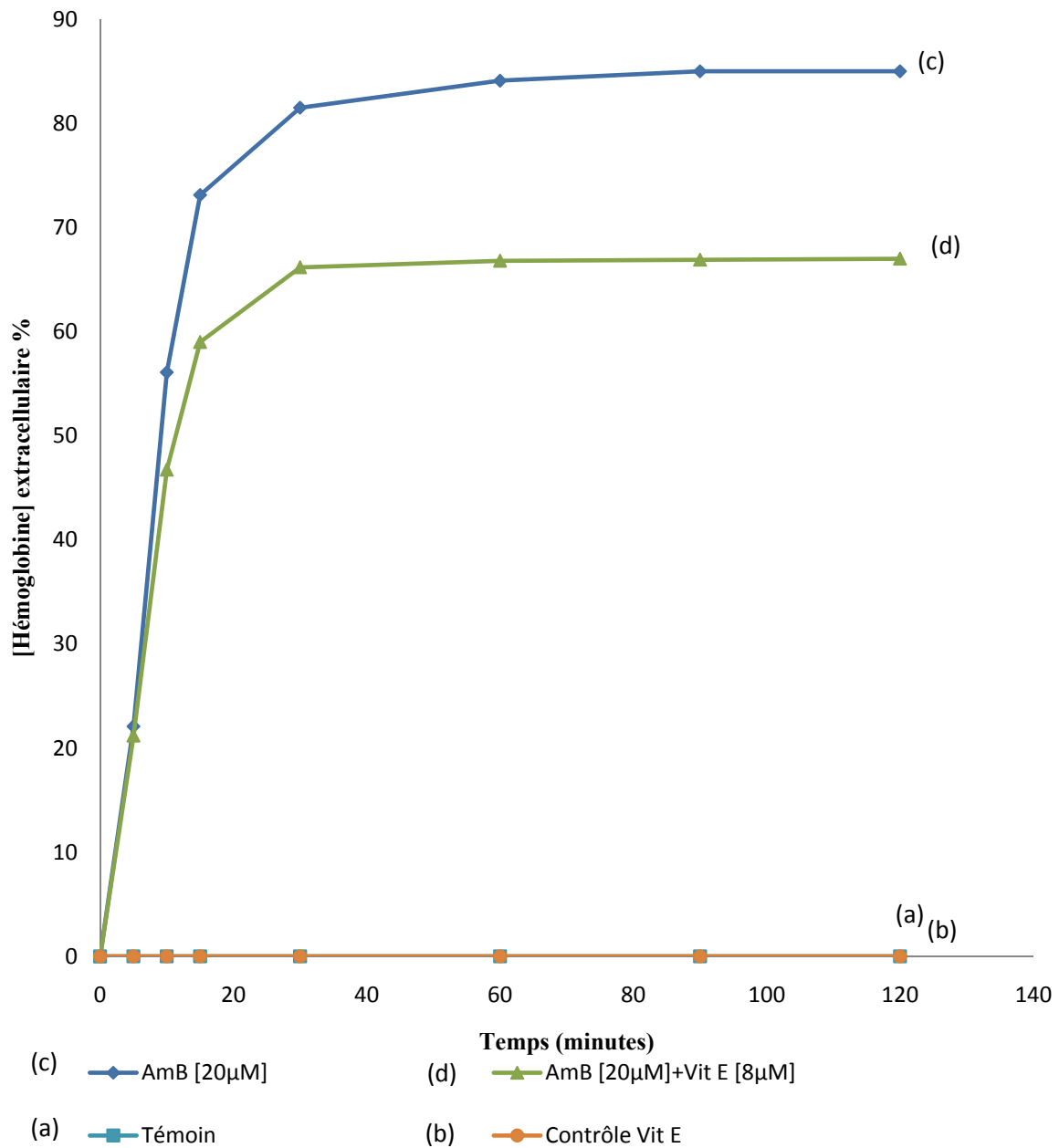


Figure N°15 : Effet de la vitamine E additionnée à l'AmB sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les érythrocytes.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que dans le but de la recherche de nouvelles stratégies qui ont pour objectif l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B c'est-à-dire réduire sa toxicité vis-à-vis des cellules animales sans altérer son efficacité vis-à-vis des cellules fongiques et des levures, l'incorporation des molécules antioxydantes au milieu réactionnel d'antifongique que nous proposons semble être une approche prometteuse.

L'addition de la vitamine C et E à des concentrations finales de 1.4mM et 8×10^{-3} mM respectivement dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B, provoque une inhibition de la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231. Cette inhibition se traduit par un prolongement de la phase de latence de 24h en présence d'AmB seule à 27 h en présence du complexe AmB-Vitamines. Nous remarquons que l'on prolonge le temps d'incubation des levures dans le milieu de culture, la croissance et la division cellulaire reprennent de nouveau. Nous pouvons conclure que sous l'effet de l'amphotéricine B, les cellules perdent leurs constituants cellulaires et finissent par mourir. Néanmoins, un certain pourcentage de cellules échappe à l'effet toxique de cette drogue. Ces cellules capables de ressusciter si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 24 heures sont appelées les cellules dormantes. Cela pourrait expliquer les échecs thérapeutiques dans les traitements antifongiques.

Pour les tests de cytotoxicité, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, il s'agit du globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain. Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'incorporation de la vitamine C et E dans le milieu réactionnel à des concentrations finales de 1.4mM et 8×10^{-3} mM respectivement induit une protection du globule rouge contre la toxicité de l'AmB qui serait due fort probablement au pouvoir antioxydant des vitamines.

Les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B supplémentée des vitamines, le meilleur résultat obtenu correspond à l'addition de la vitamine E au milieu réactionnel d'AmB.

Quatrième partie: Conclusion générale

Dans le cadre des travaux de recherches entrepris au niveau du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, nous avons proposé l'incorporation des molécules antioxydantes (la vitamine C et la vitamine E) dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B afin d'étudier l'effet de ces vitamines sur la toxicité sélective de l'antifongique aussi bien l'activité antifongique que la toxicité cellulaire.

Il ressort de ce travail que:

- L'addition des vitamines C et E au milieu réactionnel d'amphotéricine B à des concentrations finales : 0,4 μ M, 1,4mM, 8x10⁻³ mM respectivement, augmente l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* de 6,5% pour la vitamine C et de 12% pour la vitamine E. Cela est dû au pouvoir antioxydant des vitamines qui confère une protection contre l'autoxydation de la molécule d'amphotéricine B.
- L'examen microscopique de *Candida albicans* sous l'effet de nos formulations (amphotéricine B et vitamines) révèle une destruction membranaire due à l'effet de l'amphotéricine B avec une diminution de la charge cellulaire en présence des vitamines.
- Nous constatons qu'en présence des vitamines la CMI et la CMF de l'amphotéricine B ont nettement diminué d'un facteur de 4.
- Concernant la cytotoxicité, l'amphotéricine B a provoqué une lyse cellulaire, la fuite de l'hémoglobine arrive à 85%, l'addition de la vitamine C et la vitamine E a réduit l'effet toxique induit par l'amphotéricine B jusqu'à un taux d'hémolyse qui arrive à 69% et à 67% respectivement ; ceci est dû principalement au pouvoir antioxydant de ces molécules.
- L'index thérapeutique de l'amphotéricine B supplémentée des vitamines est nettement amélioré, le meilleur résultat obtenu correspond à l'addition de la vitamine E au milieu réactionnel d'AmB.

Perspectives :

- Tester l'activité fongitoxique de nos formulations sur des modèles animales.
- Effectuer des études microscopiques plus approfondies pour étudier le mécanisme d'action de nos formulations et les changements morphologiques des souches testées.
- D'élargir cette étude à d'autres antioxydants et d'autres souches de levures.
- Effectuer des études comparatives avec d'autres antioxydants.

**Cinquième partie:
Références
bibliographiques**

1. **Adams M. and Kwon G.S., (2004)** Spectroscopic investigation of the aggregation state of amphotericin B during loading, Freez-drying and reconstitution of polymeric micelles. *J. pharm pharmaceut SCI*; 7:1-6.
2. **Andrès E., Tiphine M., Letscher-Bru V. and Herbrecht R., (2001)** Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. *Revue de la littérature Rev Méd Interne*; 22 : 141-50.
3. **Andrews F. A., Beggs W. H. and Sarosi G. A., (1977)** Influence of Antioxidants on the Bioactivity of Amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ; p. 615- 618, Vol. 11, N° 4
4. **Arseny S., Kaprelyants A.S. and Mukamolova G.V., (1994)** Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin mysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution. *FEMS Microbiol. Lett*; 115: 347-352
5. **Atmaca S. and Çiçek R., (1996)** Effects of Ascorbic Acid on Amphotericin B and Nystatine Activities Against *Candida albicans*. *Antimicrobics and Infectious Diseases* ; 15 : 6- 8
6. **Baginski M., Resat H. and McCammon J. A., (1997)** Molecular Properties of Amphotericin B Membrane Channel: A Molecular Dynamics Simulation. *Molecular pharmacology* ;52:560- 570
7. **Baginski M., Resat H. and Borowski E., (2002)** Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B–cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*; p 63- 78, Vol 1567
8. **Baginski M., Sternal K., Czub J. and Borowski E., (2005)** Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochimica Polonica*; 655- 658, Vol. 52 N°3
9. **Beggs W.H., Andrews F.A. and Sarosi G.A., (1977)** Synergistic Action of Amphotericin B and antioxidants against certain opportunistic yeast pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. P. 266-270, Vol. 13, N°2
10. **Binet A. and Bolard J. (1988)** Recovery of hepatocytes from attack by the pore former amphotericin B. *Biochem. J.*;253: 435-440.
11. **Bohemier G., (2010)** Les bienfaits de la vitamine E. *L'Institut de formation naturopathique*. consulté le 18/08/2010 : sur le lien :
http://www.masantenaturelle.com/chroniques/collaborationgb/collaborationgb_bienfaits_vitamine-e.php

12. **Boucherit Z., SEKSEK O. and BOLARD J., (2007)** Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. *Medical Mycology* 45, 525_533
13. **Bourgeois C., (2003)** Les vitamines dans les industries agroalimentaires. *collection. STA, p. 708*
14. **Brajtburg J., Medoff G., Kobayashi G. S., Elberg S. and Finegold C., (1980)** Permeabilizing and Hemolytic Action of Large and Small Polyene Antibiotics on Human Erythrocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy; Vol. (18) N° 4: 586- 592*
15. **Brajtburg J., Elberg S., Medoff J. and Kobayashi G.S., (1981)** Increase in colony-forming units of *Candida albicans* after treatment with polyene antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 19: 199-205
16. **Brajtburg J., Elberg S., Schwartz D.R., Vertut-Croquin A., Schlessinger D., Kobayashi G.S. and Medoff G., (1985)** Involment of oxidative damage in erythrocytes lysis induced by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 27: 172-176
17. **Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G.S. and Medoff G., (1990)** Inhibition of amphotericin B (Fungizone). Toxicity to cells by egg lecithin-glycocholic acid mixed micelles. *Antimicrob. Agents Chemother*; 34: 2415-2416
18. **Brajtburg J., Elberg S., Travis S. and Kobayashi G.S., (1994)** Treatment of murine candidiasis and cruptococcosis with amphotericin B incorporated into egg lecithin bile salt mixed micelles. *Antimicrob. Agents Chemother*; 38: 294-299
19. **Brajtburg J. and Bolard J., (1996)** Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clinical microbiology. Vol (9) N°4: 512-531*
20. **Carbon C., Regnier B., Saimot G., Valide J.L. and Yeni P. (1994)** Antifongiques : données générales. *Ed. Médecine Science Flammarion: 449-461*
21. **Carle S., (2003)** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel Vol. 36 N° 1*
22. **Carrillo-tripp M., De vries A.H., Hernandez R., Vargas C., Saint-Martin H and Ortega-Blake I., (2010)** Molecular action mechanism of amphotericin B and structural analogs on biological membranes. *Biophysical Journal*, 98: 107
23. **Casamajor P. and Descroix V., (2009)** La prescreption ciblée en odontologie. *Les antifongiques. Ed. CDP : 70*
24. **Chavanet P., (1997)** Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone) : vieux médicament, nouvelles versions. *Rev Méd Interne; 18 : 153- 165*

25. **Chevrel G., (2009)** 300 médicaments injectables. *Ed .Elsevier Masson*: 261-267
26. **Christopher V., (2003)** Manuel de détoxication : Santé et Vitalité par l'élimination des toxines, *Editeur : Jouvence, Collection : Sante-Alimentation; p.192*
27. **Cillard J. and Cillard P., (2006)** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ocl. vol. 13 N° 1, p ;24-29*
28. **Clejan S. and Bittman R., (1985)** Rates of amphotéricine B and filipin association with sterols: a study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *The journal of biological chemistry*; 260 N°5: 2884-2889
29. **Cohen Y. and Jacquot C., (2008)** Pharmacologie. 6eme Edition. *Elsevier Masson*: 384-386
30. **Collignon A. Beljean-Leymarie M., Farinotti R and Doutremepuich C., (2007)** Infectiologie: Antifongiques. 3eme Edition. *le moniteur des Pharmacies*: 879-890
31. **Curtay J.P and Robin J.M., (2000)** Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie. Octobre 2000 Nutrithérapie Info ; 1-4
32. **Cuvelier C. Dotreppe O. and Istasse L., (2003)** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét ; 147 : 315- 324*
33. **Czub J., Borowski E and Baginski M., (2007)** Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes—A molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica acta*; 1768: 2616-2626
34. **Czub J., Neumann A., Borowski E. and Baginski M., (2009)** Influence of a lipid bilayer on the conformational behavior of amphotericin B derivatives — A molecular dynamics study. *Biophysical Chemistry*; 141: 105-116
35. **De Kruijff B. and Demel R.A., (1974)** Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acoleplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta*; 339: 57-70
36. **Ellis D., (2002)** Amphotericin B: spectrum and resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy SI*; 7- 10
37. **Eriksson U., Seifert B. and Schaffner A., (2001)** Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate. *BMJ* ; 322:1-6
38. **Espinel-Ingroff A., Fothergill A., Peter J., Rinaldi M. G. and Walsh T. J., (2002)** Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *Journal of clinical microbiology*; p. 3204- 3208 Vol. 40, N° 9

39. **EUCAST E. Dis 7.1, (2008)** method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* ; 14 : 398- 405
40. **Faucher J. L. and Avril J. L., (2002)** Bactériologie générale et médicale. *Editions Ellipses*, p. 368
41. **Fontaine E., (2002)** Production et élimination des radicaux libres oxygènes. *Laboratoire de Bioénergétique fondamentale et appliquée, Université Joseph Fourier, Grenoble* ; Chapitre 06 : P.1-4.
42. **Gaboriau F., Cheron M., Leroy L. and Bolard J., (1997)** Physico-chemical properties of heat-induced superaggregates of amphotéricin B. *Biophysical Chemistry*; 66: 1-12
43. **Gabrielska J., Gagos M, Gubernator J. and Gruszecki W.I., (2006)** Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: A HNMR study. *FEBS letters*; 580: 2677-2685
44. **Gold W., Stout H. A., Pagona J. F. and Donovick R., (1956)** Amphotericin A and B: antifungal antibiotic produced by a streptomycete. *Antibiot. Annu.* 1956:579-586
45. **Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B. and Athmani-Guemouri S., (2008)** Microbiologie ; Travaux Pratique. *Office des Publications Universitaires*; p. 85- 97
46. **Hac-Wydro K., Łatka D., Grzybowska J. and Borowski E., (2005)** N-(1 Piperidinepropionyl) amphotericin B methyl ester (PAME) a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. *journal of Colloid and Interface Science*; 287 : 476–484
47. **Hellopro., (2010)** Microscope électronique à balayage Minimeb TM-1000 Hitachi. consulté le 10/08/2010 : sur le lien : <http://www.hellopro.fr/microscope-electronique-a-balayage-minimeb-tm-1000-hitachi-2010506-175674-produit.html>
48. **Hereć M., Islamov A., Kuklin A., Gagos M and Gruszecki W.I., (2007)** Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine. *Chimistry and physics of lipids*; 147: 78-86
49. **Hianik T., Ostatnik L., Polohova V and Bolard J., (2008)** Changes of conductance and compressibility of bilayer lipid membranes induced by oligonucleotide-cationic polyene antibiotic complexes. *Bioelectrochemistry* ;74: 2–8
50. **Joly V., Saint-Pierre-Chazalet M., Saint-Julien L., Bolard J., Carbon C. and Yeni P., (1992)** Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and the toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. *J. Infec. Dis.*; 165:337-343

51. **Kaprelyants A.S. and Kell D.B., (1993)** Dormancy in stationary-phase culture of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Env. Microbiol.*; 59: 3187- 3196
52. **Kéri G. and Toth I., (2003)** Molecular pathomechanisms and new trend in drug research. *CRC press Ed* : 283-284
53. **Kerridge D., (1979)** The polyene macrolide antibiotics. *Postgraduate Medical Journal*;55, 653-656
54. **Kito M., Akutsu H., Sugeta H., Kyogoku Y., Sohn D.H. and Sulyu B., (1987)** Association of polyene antibiotics with sterols. *Chem. Biol. Interactions* 64:61-70
55. **Kleinberg M.E. (2010)** Managing infections in patients with hematological malignancies. *Springer Edition*: 115-121
56. **Lacan Bionov D., (2001)** Oxydants /Antioxydants : un équilibre important. consulté le 18/08/2010 : sur le lien : <http://www.asahi.fr/pdf/role-des-oxydants-antioxydants.pdf>
57. **Lamy-Freund M.T., Schreier S., Peitzch R.M. and Reed W.F., (1991).** Characterization and time dependence of amphotericin B :desoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. *Journal of pharmacological science. Vol (80) : 262-266*
58. **Le Grusse J. and Watier B., (1993)** Les vitamines, données biochimiques nutritionnelles et cliniques. Editeur : *C.E.I.V. Neuilly, p. 304*
59. **Léger C. L., (2006)** Anti-oxydants d'origine alimentaire : diversité, modes d'action anti-oxydante, interactions. *OCL VOL. 13 N° 1 : 59-69.*
60. **Legrand P., Romero E. A., Cohen B. E. and Bolard J., (1992)** Effects of Aggregation and Solvent on the Toxicity of Amphotericin B to Human Erythrocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; p. 2518- 2522 Vol. 36, N° 11
61. **Lemke A., Kiderlen A. F. and Kayser O., (2005)** Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*; 68: 151- 162.
62. **Livernais-Saettel L., (2000)** Vitamine E ou Alpha-tocophérol. consulté le 16/08/2010 : sur le lien : http://www.dietobio.com/vegetarisme/fr/vit_e.htmL
63. **Martin C., (2008)** Urgences et infections : Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques, antiviraux, antiseptiques. *Edition Arnette*: 102-110
64. **Moné Y., Mitta G., Duval D. and Gourbal B.E.F., (2010)** Effect of amphotericin B on the infection success of schistosoma mansoni in biomphalaria glabrata. *Experimental parasitology. Ed Article en press*

65. **Moore D., Geoffrey D. Robson and Trinci A.P.J., (2010)** Antifungal agents that target the membrane. *21st Century Guidebook to Fungi, Chapter 18.*
66. **Neu S., Ransberger K. and Wantzen H., (1990)** Les enzymes-santé. Editeur : *Jouvence*, Collection : *Terre De Jouvence*, p. 231
67. **Nishi K.K., Antony M., Mohanan P.V., Anilkumar T.V., Loiseau P.M. and Jayakrishnan A., (2007)** Amphotericin B-Gum Arabic Conjugates: Synthesis, Toxicity, Bioavailability, and Activities Against Leishmania and Fungi. *Pharmaceutical Research*; 24, No. 5: 971-980
68. **Norman A.W., Demel R.A., De Kruijff B., Geurts Van Kessel W.S. and Van Deenen L.L., (1972)** Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparaison of other polyene with filipin in their ability to interact specifically with sterol. *Biochim. Biophys. Acta*; 290: 1-14
69. **Pasqualotto A.C., (2009)** Aspergillosis : From diagnosis to prevention. *Springer Ed*; 281-299
70. **Perlemuter L. and Perlemuter G., (2008)** Guide de thérapeutique. *5eme Edition. Elsevier Masson* : 996-1001
71. **Pincemail J., Meurisse M., Limet R. and Defraigne J.O., (1998 a)** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Medi Sphère*; N°73
72. **Pincemail J., Defraigne J.O., Meurisse M. and Limet R., (1998 b)** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires 2ème partie: la vitamine E. *Medi Sphere*; N° 90
73. **Pradalier A., Vincent D., Cauvain A., Callanquin M. and Vilde J.L., (2005)** Accoutumance à l'ambisome desensitization to liposomal amphotericin (Ambisome*). *Revue française d'allergologie et d'immunologie Clinique*; 324- 327
74. **Probiox, (2005)** Le Stress Oxydant. consulté le 22/10/2010 : sur le lien : http://www.probiox.com/fr/html/body_stressoxydant.htm
75. **Raisonnier A., (2002)** Structures Biologiques : Biochimie métabolique et Régulations. *Université Paris-VI* ; P. 31/ P.63
76. **Rao T.V.G., Trivedi A. and Prasad R., (1985)** Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. *Can. J. Microbiol.*; 31:322-326
77. **Rojas Gonzalez J.A., (2007)** Impact de l'opération de friture du plantain (*Musa AAB* « barraganete ») sur différents marqueurs nutritionnels : caractérisation et modélisation. *Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement*; p. 17-18

78. **Safe L.M., Safe S.H., Subden R.E. and Morris, (1977)** Sterol content and polyen antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*. *Can. J. Microbiol.*; 23 : 398-401
79. **Satam S., (2007)** Les antioxydants et la chaîne des radicaux libres. consulté le 27/11/2010 : sur le lien : <http://www.goldshieldelite.com/downloads/LT639WB.pdf>
80. **Scholer H.J. and Polak A. (1984)** Resistance to systemic antifungal agents. Antimicrobial Drug Resistance. *Academic Press Inc.*; 23: 398-401
81. **Seoane R., Minones J., Conde O., Casas and Iribarnergaray E., (1998)** Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols: a monolayer study. *Bichim. Biophys. Acta* 1375:73-83
82. **Sokol-Anderson M.L., Brajtburg J. and Medoff G., (1986)** Amphotericin B induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.*; 154:76-83
83. **Stolarska B., (2005)** Vitamine E : état de la recherche, innocuité, efficacité. *Natural Factor* ; p.1- 6
84. **Tripathi R. P., Singh B., Bisht S. S. and Pandey J., (2009)** L-Ascorbic Acid in Organic Synthesis: An Overview. *Current Organic Chemistry*; 99- 122Vol. 13, N°. 1
85. **Van-Bambeke F., (2009)** Antifongiques. *Farm* 2129
86. **Vandeputte P., (2008)** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *candida glabrata*; Page 12-13
87. **Vertut-Doï A., Ohnishi S.I. and Bolard J., (1994)** The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.*; 38 N°10 : 2373-2379
88. **Wang C., Wang W and Hsiue G., (2009)** Development of polyions complex micelles for encapsulating and delivering amphotericin B. *Biomaterials*; 30: 3352-3358
89. **Wojtowicz K., Gruszecki W.I., Walicka M. and Barwicz J., (1998)** Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membrane: Colorimetry, Ultrasound absorption and monolayer technique studies. *Biochimica et Biophysica acta*; 1373: 220-226

الملخص

زاد انتشار الإصابة بالعدوى الفطرية، بما في ذلك المنقولة عن طريق الدم، بشكل كبير في السنوات الأخيرة. يقوم العلاج المعياري لهذه الإصابات على استخدام الأمفوتريسين ب على الرغم من كونها مصدر لأعراض جانبية شديدة السمية، التي قد تهدد حياة المصاب في بعض الأحيان.

العمل الذي قمنا به يتركز من ناحية على تقييم فعالية الأمفوتريسين ب في وجود بعض مضادات الأكسدة الطبيعية (فيتامين C) "حمض الأسكوربيك" وفيتامين (E) "α توكوفيرول" على نشاط الخميرة *Candida albicans* ATCC 10231 و من ناحية أخرى باختبار السمية لهذه المستحضرات على خلايا الدم الحمراء.

أظهرت النتائج تحسنا ملحوظا في كفاءة صبغنا المختبرة مقارنة بالأمفوتريسين ب وحده عند التركيز 0,4 ميكرو مول. فنلاحظ، أن درجة تثبيط الأمفوتريسين ب في وجود الفيتامين C عند التركيز النهائي 1,4 ملغ / مل قد ارتفع إلى 7 % و إلى 12 % في وجود فيتامين (E) عند التركيز النهائي 8 ميكرو غ / مل. فيما يتعلق باختبار السمية، إضافة فيتامين (C) وفيتامين (E) بتركيزين مختلفين 1,4 ملغ/مل و 8 ميكروغ/مل، على التوالي، يقلل من التأثير السام الناتج عن الأمفوتريسين ب من معدل 85 % إلى معدل 69 %.

كلمات البحث: *Candida albicans*، الأمفوتريسين ب، فيتامين (C)، فيتامين (E)، مضادات الأكسدة، الفعالية، اختبار السمية

Résumé

L'incidence des infections fongiques ou mycoses, notamment hématogènes, a considérablement augmenté au cours des dernières années. Le traitement de référence pour ces infections est basé sur l'utilisation de l'amphotéricine B malgré qu'elle soit à l'origine de phénomènes toxiques très sévères mettant en jeu parfois le pronostic vital.

Le travail que nous avons entrepris a porté, d'une part, sur l'évaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en présence de quelques antioxydants naturels (vitamine C « acide ascorbique » et vitamine E « α tocophérol ») ; vis-à-vis la levure *Candida albicans* ATCC 10231 d'une part. D'autre part, nous avons testé la cytotoxicité de ces formulations sur les globules rouges humains.

Les résultats obtenus ont montré une nette amélioration de l'efficacité de nos formulations testées par rapport à l'amphotéricine B seule à une concentration finale de 0,4 µM. En effet, le degré d'inhibition est de 7% en présence de la vitamine C à une concentration finale de 1,4 mg/ml et de 12 % en présence de la vitamine E à une concentration finale de 8 µg/ml. Par ailleurs, l'addition de la vitamine C et la vitamine E, protège les globules rouges humains contre la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B. En effet, la fuite de l'hémoglobine passe de 85 % en présence d'amphotéricine B seule à 69 % en présence d'amphotéricine B complexée aux deux vitamines étudiées.

Mots clés : *Candida albicans*, Amphotéricine B, Vitamine C, Vitamine E, Pouvoir antioxydant, Efficacité, Cytotoxicité

Abstract

The incidence of fungal infections or mycoses, including hematogenous, has increased dramatically in recent years. The reference treatment for these infections is based on the use of amphotericin B despite being the source of severe toxic reactions, sometimes involving life-threatening.

The work we have undertaken focused on valuating the effectiveness of amphotericin B in the presence of some natural antioxidants (vitamin C "ascorbic acid" and vitamin E "α tocopherol") towards the yeast *Candida albicans* ATCC10231 for one thing. Secondly, we tested the cytotoxicity of these formulations on human red blood cells.

The results obtained showed a marked improvement in the efficiency of our formulations tested against amphotericin B alone 0.4 µM. Indeed, the degree of inhibition of amphotericin B in the presence of Vitamin C at a final concentration of 1.4 mg/ml increase of 7 % and 12 % in the presence of vitamin E to a final concentration of 8 µg/ml. Concerning the cytotoxicity, the addition of vitamin C and vitamin E at the concentrations, 1.4mg/ml and 8 µg/ml respectively, reduces the toxic effect induced by amphotericin B of a hemolysis rate of 85 % to 69 %.

Keywords: *Candida albicans*, amphotericin B, Vitamin C, Vitamin E, Antioxidant, efficacy, Cytotoxicity